EFECTO DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA (RUV) SOBRE LOS PROCESOS DE ESTRÉS OXIDATIVO E INMUNODEPRESIÓN CUTÁNEA. EFECTO PROTECTOR DE LOS FILTROS SOLARES.

TESIS DOCTORAL

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD "ROVIRA I VIRGILI"

Miquel Mulero Abellán

Reus, 2004

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna forma, mediante su apoyo y colaboración, han hecho posible la realización de esta tesis. Y en concreto y muy especialmente querría demostrar mi gratitud a las siguientes personas e instituciones:

A la Dra. Rosa Nogués, por sus conocimientos, por su trabajo constante, colaboración y apoyo durante estos años, en la realización de este trabajo.

Al Dr. Jordi Mallol, por darme la posibilidad de trabajar en esta unidad y por su capacidad, disponibilidad y paciencia.

A la Dra. Montserrat Giralt, por su gran calidad investigadora y personal. Gracias por tus consejos, predisposición y paciencia.

A Marta Romeu por su tenacidad, eficacia y capacidad de trabajo. Así como, por su compañía y ayuda, sin la que este trabajo no habría sido posible.

Al Dr. Francesc Sureda, por su amistad, disponibilidad y buen humor en las largas horas de trabajo.

A Vanesa por su gran capacidad de trabajo, calidad, eficacia, así como por su compañía y alegría durante las horas compartidas en el laboratorio.

A NOVARTIS CONSUMER HEALTH, por su aportación a la beca de la FURV, sin la que no habría podido desarrollar este trabajo.

A la FURV por haber contribuido a la gestión de la beca.

Al resto de compañeros del equipo de Farmacobiología y de la facultad por todas aquellas experiencias laborales y no-tan-laborales compartidas (Viky, Dr. Paternáin, Jaume, María, Àngels, Manel, Gemma, Sandra, Montse, Carmen, Carmen S.).

Al mejor informático jamás conocido Carles Vilardell. Por sus risas y buen sentido del humor, y por su apoyo en los momentos de crisis informáticas.

A mi fantástica familia (Mamá, Cárol, Clemente, Óscar, Petit, Yayos y todos los demás, que son muchos) por su apoyo constante.

A mis grandes compañeros/as de fatigas Núria, Xavi, Eli, Xavi A., Pere, Cris, Edu.

A Lur.

I. PRESENTACIÓN

Esta tesis doctoral es el fruto de cuatro años de trabajo en el ámbito de la investigación del estrés oxidativo derivado de la exposición a la luz ultravioleta (UV) y se ha desarrollado como parte específica de una línea de trabajo del grupo de Farmacobiología Celular de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad Rovira y Virgili de Reus.
El estrés oxidativo es una consecuencia directa del necesario consumo de oxígeno por parte de los organismos vivos aerobios, y su intensidad y consecuencias dependen de la capacidad de nuestros sistemas de defensa específicos para contrarrestar las especies reactivas del oxígeno (ERO) generadas, entre las cuales destacan los radicales libres del oxígeno (RLO). Numerosas circunstancias, fisiológicas o patológicas, pueden incrementar la producción de RLO y, por tanto, aumentar el estrés oxidativo. Entre ellas está la radiación UV (RUV), a la que todos nosotros estamos expuestos con mayor o menor intensidad y asiduidad.
La exposición a la RUV es causa de numerosas alteraciones cutáneas, incluido el cáncer de piel. El progresivo aumento de este tipo de cáncer en las últimas décadas ha suscitado una gran preocupación sanitaria y social, por lo cual todos los aspectos relacionados con la fotoprotección son objeto de investigación desde diversos puntos de vista: físico, químico, biológico y sanitario.

En este sentido, no cabe duda de que actualmente disponemos de una información muy valiosa acerca de los riesgos de la exposición a la RUV y, al mismo tiempo, existen fotoprotectores muy eficaces y desarrollados con criterios científicos avanzados. No obstante, y a pesar de que el consumo de fotoprotectores no cesa de incrementarse, la incidencia del cáncer de piel sigue aumentando. Con este trabajo pretendemos llamar la atención sobre la falsa sensación de seguridad que puede derivarse del uso incorrecto de fotoprotectores y sobre la necesidad de revisar en profundidad algunos de los conceptos sobre los que se basa la fotoprotección.

II. INTRODUCCIÓN

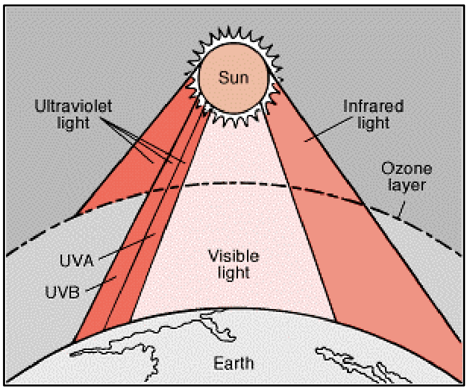
1. LUZ SOLAR

Ya hace más de 400 años que Copernico declaró que el sol era el centro del universo. A lo largo de la historia, la especie humana ha tenido una relación especial con el sol. Desde Egipto hasta Méjico se rendía culto al astro rey, que era considerado como el dios que daba calor y permitía el crecimiento de los cultivos. De hecho, no hay ningún aspecto del mundo en el que vivimos que no esté influenciado por el sol. Desde la fotosínteis hasta nuestro estado de ánimo, están condicionados por dicho astro. No es de extrañar, pues, el papel central que juega la radiación solar en nuestra vida diaria. A pesar de ello, no todos los aspectos de dicha radiación son positivos; ya que como veremos a continuación, existen unos efectos deletéreos causados por la naturaleza intrínseca de la radiación solar.

El sol emite diversos tipos de radiaciones: rayos X, radiaciones ionizantes, radiaciones ultravioleta (RUV), luz visible, radiaciones infrarrojas y otras.

Desde el punto de vista fotobiológico el espectro solar en la superficie terrestre (nivel del mar) está formado por radiaciones con longitudes de onda de energía electromagnética comprendida entre 290 y 3000 nm. Y debido a esta gran diversidad, desde el punto de vista de la práctica clínica se considera que el espectro solar está formado por: radiaciones ultravioleta (290-400 nm), luz visible (400-760 nm) y radiaciones infrarrojas (>1800 nm). (Pathak, 1996).

La proporción de cada una de las radiaciones es la siguiente:



- **40% luz visible**
- **50% radiación infrarroja**
- **10% radiación ultravioleta**

Figura 1. Proporción y atenuación de las radiaciones incidentes sobre la superficie terrestre.

Aunque el sol emite radiaciones de longitud de onda menores a 290 nm, dichas radiaciones no llegan a la superficie terrestre debido a la selectiva absorción que sufren por parte de las moléculas de ozono y oxígeno molecular presentes en la estratosfera (Figura 1).

Por lo tanto, hay una radiación incidente de elevada energía que se ve atenuada por los componentes de la estratosfera, haciendo que la energía que recibamos sea menor a la inicial.

La mayoría de los efectos perjudiciales para la salud, principalmente sobre la piel, se deben a la acción de la radiación ultravioleta. La luz visible y la radiación infrarroja son generalmente inocuas para el hombre (Ribera y Paradelo García, 1997).

Por convenio, el espectro ultravioleta se subdivide arbitrariamente en tres bandas de mayor a menor longitud de onda. Estas bandas o regiones se denominan UVA, UVB y UVC respectivamente.

La región UVA abarca de los 400 a los 320 nm. Este espectro es el responsable de la reacción de pigmentación de la piel, y de muchos otros efectos como son el fotoenvejecimiento de la piel (elastosis solar) y la fotosensibilización (Gilchrest y Tang, 1996).

La banda correspondiente a UVB engloba a las radiaciones comprendidas entre los 320 y 290 nm. Tiene también una marcada acción pigmentógena y es la región responsable de las quemaduras solares; otro efecto importante que se le atribuye es el cáncer cutáneo.

La radiación UVC comprende las longitudes de onda menores a 290 nm (200-290 nm). Esta región es eritematógena, mutagénica y carcinogénica; pero no está presente en la superficie terrestre debido a la filtración producida por la capa de ozono.

Existe una creciente preocupación respecto las radiaciones UVC y UVB, ya que debido a la persistente y continua degradación de la capa de ozono de la estratosfera por parte de los fluorocarbonos, CFCs, etc., se prevé un incremento de los niveles de irradiación sobre la superficie terrestre de estas dos regiones del espectro ultravioleta, así como de los efectos nocivos que estas radiaciones pueden producir sobre la salud (Amron y Moy, 1991).

2. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA PIEL

La piel se compone de dos capas: la epidermis y la dermis. Por debajo de ella se encuentra el tejido subcutáneo conocido como tejido celular subcutáneo o panículo adiposo.

La epidermis, que es la capa más externa, está directamente en contacto con el medio ambiente.

La epidermis adulta está compuesta por tres tipos celulares básicos: queratinocitos, melanocitos y células de Langerhans. Dos tipos adicionales de células, la célula dendrítica indeterminada y la célula de Merkel pueden encontrarse ocasionalmente en el interior de la epidermis.

El queratinocito, o célula escamosa, es la célula principal de la epidermis. Tiene la función especializada de producir queratina, que es un proteína filamentosa que cumple una función protectora y que no solamente forma la capa superficial (estrato córneo) de la epidermis, sino que también es la proteína estructural del pelo y de las uñas.

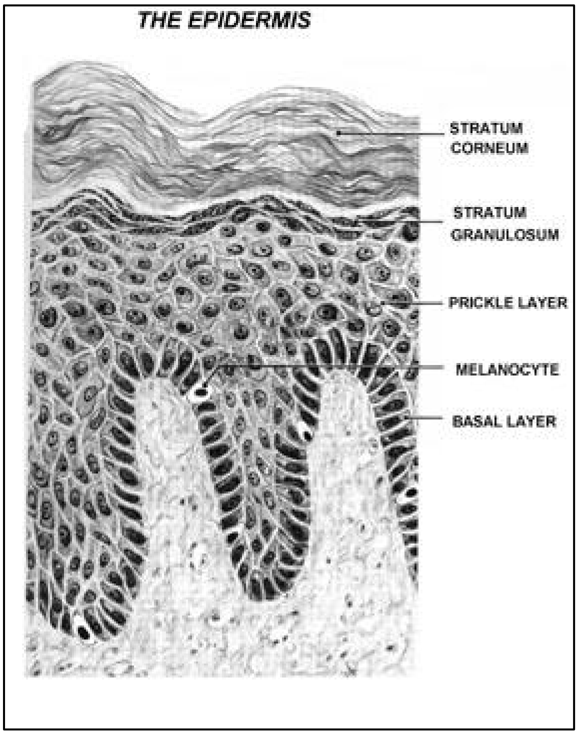
La epidermis puede dividirse en las siguientes zonas (Figura 2), comenzando por la capa más interna: capa basal, capa de Malpighi o de células espinosas, capa granulosa y capa córnea o estrato córneo. Estos nombres reflejan el diferente aspecto del queratinocito a medida que se va transformando en célula queratinizada.

El melanocito es la célula productora de pigmento (melanina) de la epidermis. En la epidermis adulta normal, los melanocitos se asientan en la capa basal, con una frecuencia de aproximadamente uno por cada diez queratinocitos basales. El número de melanocitos en la epidermis es constante, independientemente de la raza o del color de la piel; es más bien el número y el tamaño de los melanosomas, o gránulos de pigmento sintetizados continuamente por estos melanocitos, lo que determina las diferencias raciales en la coloración de la piel. Aunque el melanocito es la fábrica de pigmentos de la piel, los melanosomas sintetizados por él son continuamente transportados a los queratinocitos adyacentes, que actúan como depósitos del pigmento en la piel.

Los melanocitos de la piel oscura sintetizan melanosomas de mayor tamaño que los producidos en la piel clara. El tamaño del melanosoma es el principal factor que determina la forma de distribución de los melanosomas en los queratinocitos. Los

grandes melanosomas de la piel oscura están dispersos aisladamente en el citoplasma de los queratinocitos; los melanosomas menores de la piel clara están agrupados en complejos revestidos de membrana en el interior del queratinocito. La exposición crónica al sol puede "engañar" al melanocito para que produzca melanosomas de mayor tamaño haciendo así que la distribución de los melanosomas en los queratinocitos se asemeje al patrón que se observa en los sujetos de piel oscura.

Las células de Langerhans se encuentran normalmente dispersas entre los queratinocitos del estrato espinoso. Constituyen el 3-5% de las células de esta capa. Funcionalmente, las células de Langerhans pertenecen a la línea de los monocitos-macrófagos, y se originan en la médula ósea. Desempeñan un papel en la inducción del rechazo de injertos, en las reacciones de hipersensibilización por contacto y en la inmunovigilancia.



La dermis es la capa intermedia. Su principal componente es una proteína estructural fibrosa denominada colágeno. La capa más interna de la piel es el tejido celular cutáneo o panículo adiposo, está compuesto por lóbulos de adipocitos o células grasas.

Respecto a la RUV, los estudios se centran mayoritariamente en epidermis, ya que como veremos posteriormente con mayor detalle, corresponde a la porción de la piel más afectada por dicha irradiación

Figura 2. Ilustración de las diferentes capas de la epidermis. Los nombres de las diferentes capas corresponden a los diferentes estadíos de maduración de los queratinocitos que las componen.

3. EFECTO DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA SOBRE LA PIEL

La presencia de la radiación solar asociada a la vida en una atmósfera rica en oxígeno produce efectos indeseados y perjudiciales sobre la piel. La consecuencia más severa del daño producido por la radiación solar es el cáncer de piel. Cambios menos severos, reflejo del fotoenvejecimiento cutáneo, son la presencia de arrugas, descamaciones, sequedad de la piel y anormalidades en la pigmentación cutánea como la hiper y la hipopigmentación.

Para que ocurra una reacción fotoquímica en la epidermis, es necesario que la radiación ultravioleta sea absorbida por un cromóforo, iniciándose así una serie de reacciones fotoquímicas que desembocarán en un fotoenvejecimiento o incluso en un cáncer cutáneo (Trautinger, 2001).

Estas reacciones fotoquímicas pueden implicar cambios en el DNA, incluyendo la oxidación de los ácidos nucleicos.

Las reacciones oxidativas pueden también modificar proteínas y lípidos, produciendo, en consecuencia, cambios en la funcionalidad de las estructuras afectadas. La acumulación de dichas oxidaciones puede desembocar en envejecimiento tisular, y si la capacidad natural del organismo para contrarrestar este acumulo de oxidaciones se ve superada por el efecto de las radiaciones ultravioletas, asociadas a la presencia de otros generadores de radicales libres (humo del tabaco, polución), pueden aparecer daños oxidativos más graves.

CROMÓFOROS

Existen muchas moléculas capaces de absorber la luz UV en la piel, entre las cuales el DNA y el ácido urocánico se consideran cromóforos con relevancia biológica.

El DNA puede absorber UVB (290-320 nm), produciéndose cambios entre bases de pirimidina adyacentes de una hebra del DNA. Ello da lugar a la formación de dímeros de ciclopirimidina, particularmente los dímeros de timina o, menos comúnmente, los 6-4 fotoderivados. El espectro de acción para estos cambios es máximo sobre los 300 nm, aunque los rayos UVA (320-400 nm) pueden también generar dímeros de timina (Young et al., 1998; Kielbassa y Epe, 2000).

El ácido urocánico ha sido identificado recientemente como el segundo cromóforo para las reacciones fotoquímicas en la piel (Hanson y Simon, 1998; Simon, 2000). Un fotón de luz tiene suficiente energía como para generar oxígeno singulete (Darr y Fridovich, 1994). Cuando la luz UV es absorbida por el ácido trans-urocánico, se genera una molécula de oxígeno singulete, que como veremos posteriormente es una especie de elevada reactividad que puede atacar estructuras celulares y generar otras especies reactivas de oxígeno.

ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ERO)

Las ERO se generan de manera habitual durante las reacciones metabólicas tisulares, incluyendo en la piel (Young y Woodside, 2001; Bergendi et al., 1999). La mayoría del oxígeno del organismo es utilizado en el metabolismo celular. A través de una serie de adiciones de un electrón, el oxígeno molecular es secuencialmente transformado en anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y finalmente en agua (Figura 3). La mayoría de las reacciones ocurren en la mitocondria y están relacionadas con la producción de energía. Las enzimas celulares y los procesos metabólicos controlados, habitualmente mantienen el daño oxidativo de las células al mínimo. En cambio, en situaciones de elevada demanda metabólica y en presencia de agentes externos como la luz solar, el tabaquismo o la polución, en las que los mecanismos de protección pueden no ser adecuados o suficientes, puede producirse un daño oxidativo, como veremos posteriormente.

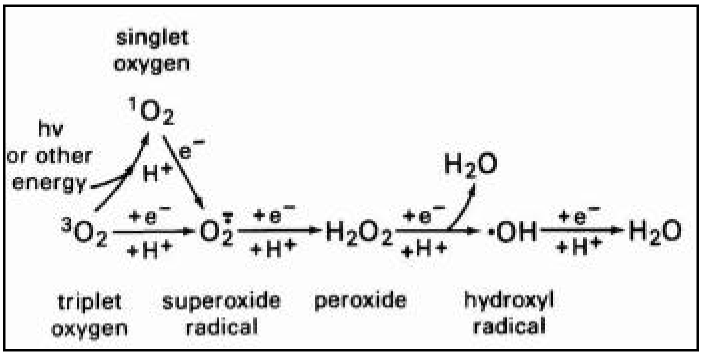


Figura 3. Transformación secuencial del oxígeno en agua por reducción progresiva.

FOTOCARCINOGÉNESIS

La radiación UVB es un carcinógeno completo y puede generar carcinomas de tipo escamoso en animales (Black et al., 1997). Como hemos dicho anteriormente, el DNA absorbe UVB, hecho que implica la generación de mutaciones puntuales del tipo C→T y CC→TT. El espectro de acción para la generación de carcinoma escamoso abarca principalmente la región UVB, aunque existe también una cierta actividad carcinogénica en UVA (de Gruijl y van der Leun, 1994). Mientras que la energía UVB es importante en la iniciación del tumor, la energía UVA interviene predominantemente en la promoción del tumor.

Comparada con la energía UVB, la radiación UVA genera mayor estrés oxidativo (Gaboriau et al., 1995; Tyrrell, 1996). En el conjunto de la radiación solar, la energía UVA es 10 veces más eficiente que la UVB en la producción de reacciones de peroxidación lipídica (Morliere et al., 1995). La radiación UVA es más citotóxica que la UVB (de Gruijl, 2000). La energía UVA daña el DNA mediante la producción de rupturas de cadena y la oxidación de los ácidos nucleicos (Wenczl et al., 1997).

La lesión mutagénica característica generada por el estrés oxidativo es la formación de 8-hidroxiguanosina, la cual genera transversiones tipo G:C a T:A mediante el emparejamiento con adenina en lugar de citosina durante el proceso de replicación (Kielbassa et al., 1997).

La radiación UVA puede inhibir la reparación del DNA (Parsons y Hayward, 1985). Además, puede inducir la síntesis de metaloproteinasas de la matriz celular (MMP), lo que puede aumentar la agresividad biológica del cáncer de piel (Fisher et al., 2001).

La luz solar puede suprimir la función inmunitaria de la piel y promover la formación de cánceres cutáneos (Streilein et al., 1994). Aproximadamente un 40% de los seres humanos son susceptibles a esta inmunosupresión inducida por la radiación UV; de hecho, virtualmente todas las personas con carcinomas cutáneos de células basales o escamosos, presentan inmunosupresión debida a la radiación UV.

Aunque la mayoría de estudios de inmunosupresión debida a la radiación UV se han llevado a cabo utilizando fuentes de energía UVB (Duthie et al., 1999), estudios recientes han resaltado la importancia de la radiación UVA en la producción de

inmunosupresión (Nghiem et al., 2001) y la capacidad de los antioxidantes para prevenirla (Halliday et al., 1998).

La importancia de la inmunosupresión en el desarrollo del cáncer cutáneo se pone de manifiesto en las personas inmunodeprimidas como consecuencia de haber sido sometidas a un transplante de órganos, ya que estas personas presentan una incidencia máxima de carcinomas cutáneos letales (Berg y Otley, 2002).

La energía correspondiente a la región UVA de la luz solar es unas 20 veces superior a la de la región UVB. Además, mientras que la radiación UVB es prácticamente absorbida en su totalidad por la epidermis, la energía UVA es capaz de alcanzar las capas dérmicas (Gilchrest et al., 1983) e incluso afectar las células sanguíneas circulantes (Moller et al., 2002). La radiación UVA, además de ser más eficiente que la UVB para la producción de ERO en la piel, provoca efectos adicionales distintos de los provocados por la radiación UVB.

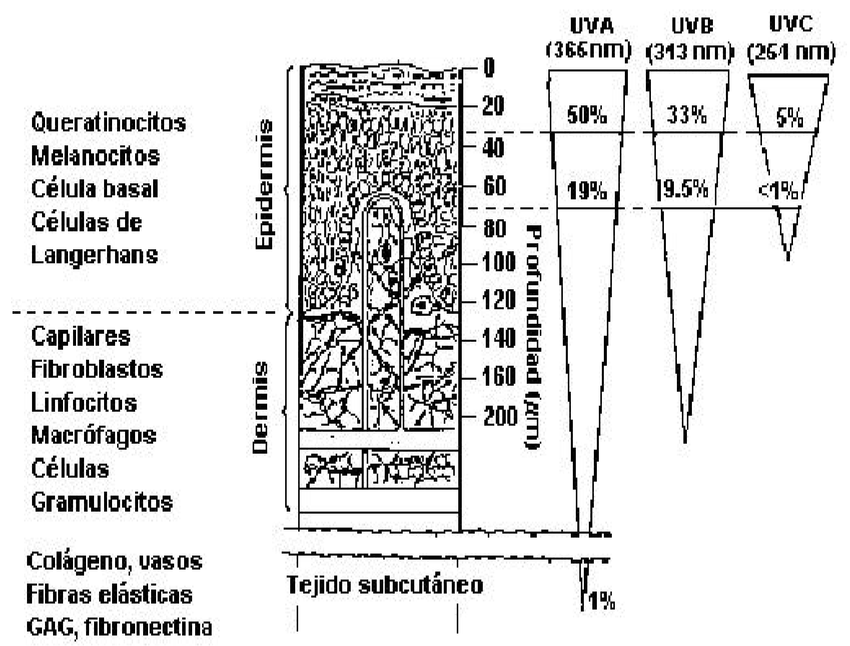


Figura 4. Capacidad de penetración de los diferentes tipos de radiación UV en la piel. (Tomado de Bruls et al., 1984)

FOTOENVEJECIMIENTO

La exposición a la luz solar tiene un profundo efecto sobre la piel, produciendo un envejecimiento acelerado que puede apreciarse a simple vista: arrugas, descamación, deshidratación, telangiectasias y alteraciones de la pigmentación (hiper e hipopigmentación) (Berneburg et al., 2000; Yaar y Gilchrest, 2001).

Microscópicamente, pueden apreciarse también numerosas alteraciones. Entre ellas, destaca la presencia de acumulaciones amorfas de fibras de colágeno desestructuradas que se tiñen con una coloración basófila. Los glicosaminoglicanos son abundantes. Los vasos sanguíneos están dilatados y con formas tortuosas. Hay una mayor presencia de células inflamatorias en la dermis. Los queratinocitos son irregulares. Los melanocitos se distribuyen de forma irregular, con zonas de mayor acumulación y zonas en las que son más escasos. El número de células de Langerhans está disminuido en la piel sometida a la radiación solar.

Debido a que la radiación UVB es absorbida de forma prácticamente completa en la epidermis, es importante tener presente que los cambios característicos del fotoenvejecimiento pueden ser producidos sólo por la radiación UVA. De hecho, estos cambios se han observado incluso en pieles protegidas con fotoprotectores y tras un escaso número de exposiciones de radiación UVA de baja intensidad (Lowe et al., 1995).

Pequeñas cantidades de radiación UV provocan la inducción de una serie de MMPs incluyendo MMP-1, MMP-2, MMP-3, y MMP-9 (Fisher et al., 1996). Estas proteasas, de forma conjunta, son capaces de degradar la matriz de colágeno de la piel. Al mismo tiempo, se inhibe la síntesis de procolágeno (Fisher et al., 2000), quizás mediante un mecanismo relacionado con la degradación del colágeno (Varani et al., 2001). En la piel expuesta a la RUV, los niveles de procolágeno I están disminuidos y la actividad de las proteínas MMP-1 y MMP-2 está incrementada, en comparación con lo que ocurre en la piel no expuesta a la radiación (Chung et al., 2001).

Estos cambios aparentemente se derivan de la inducción del factor de transcripción de activación proteica (AP-1), el cual es activado por una serie de proteincinasas, activadas a su vez por mitógenos. La radiación UV también activa al factor de transcripción nuclear K_B (NF-K_B), el cual estimula la migración de los neutrófilos

hacia el lugar de la irradiación aumentando la presencia de colagenasa neutrófila (MMP-8) y agravando de esta manera la degradación de la matriz de colágeno.

En esta activación de AP-1 y NF-K_B participan directamente las ERO, que son el denominador común de esta compleja interacción biológica (Siwik et al., 2001).

El estrés oxidativo puede también incrementar los niveles de RNA mensajero de elastina en los fibroblastos dérmicos contribuyendo así a los cambios elastóticos hallados en la dermis fotoenvejecida (Kawaguchi et al., 1997)

Las ERO pueden modificar las proteínas en los tejidos a través de mecanismos de carbonilación. Estas proteínas carboniladas se acumulan en la dermis papilar de la piel dañada por la radiación solar.

La radiación UVA induce procesos de peroxidación lipídica en membranas, lo que puede alterar la fluidez de las membranas celulares (Gaboriau, 1993).

Aparte de la afectación del DNA nuclear, el DNA mitocondrial puede también sufrir alteraciones debido al estrés oxidativo (Krutmann, 2001). Debido a que los mecanismos de reparación del DNA son menos eficientes en la mitocondria en comparación con el núcleo, las mutaciones se acumulan a un ritmo mucho mayor. En este sentido, se ha identificado una deleción común en el DNA mitocondrial y se demuestra que aparece de forma significativamente mayor en las zonas de piel fotoenvejecida (cuello, cara, etc.) respecto a las zonas de piel protegidas del sol (Birch-Machin et al., 1998). La deleción puede generarse por la radiación UVA y es mediada por el oxígeno singulete (Berneburg et al., 1999). Estas mutaciones pueden alterar la capacidad de llevar a cabo la fosforilación oxidativa y en consecuencia se puede generar mayor estrés oxidativo.

4. RADICALES LIBRES DE OXÍGENO (RLO)

Un radical libre es una especie química que contiene uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos. Un compuesto puede convertirse en radical libre captando o perdiendo un electrón. Asimismo, también pueden formarse radicales libres cuando un enlace covalente se rompe y cada electrón de la pareja compartida permanece en un átomo (fisión homolítica). Como consecuencia de poseer electrones desapareados, estas especies químicas son extremadamente

reactivas, tienen por tanto una semivida corta y su concentración en el estado estacionario es baja (Armstrong et al., 1984; Pryor, 1986; Webster y Nunn, 1988).

La molécula de oxígeno, como tal, puede ser calificada de birradical puesto que tiene dos electrones desapareados, cada uno de ellos localizado en un orbital antienlazante π^*. Sin embargo, la reactividad de esta molécula es más baja de la que cabría esperar debido a que los espines de estos dos electrones presentan direcciones paralelas. Para que el oxígeno pudiese oxidar un átomo o molécula que no fuese radical libre aceptando un par de electrones, éstos deberían ser de espines paralelos (Cadenas, 1989; Jamieson, 1989). Según el principio de exclusión de Pauli, los electrones de un orbital atómico o molecular nunca tienen direcciones paralelas, por tanto, para que el oxígeno molecular aumentase su reactividad habría de invertirse el espin de uno de los electrones de sus orbitales externos, o bien, sufrir una reducción secuencial y univalente produciendo radicales libres de oxígeno.

La inversión de los electrones de los orbitales externos del oxígeno molecular origina dos formas de oxígeno singulete: el oxígeno singulete delta que, debido a su larga semivida, es el de mayor importancia biológica, y el oxígeno singulete sigma, más reactivo que el anterior pero de corta semivida porque rápidamente decae al estado delta (Cadenas, 1989; Webster y Nunn, 1988).

Cuando un único electrón reduce la molécula de oxígeno se produce el ión radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$). Ésta es una especie química muy reactiva pero inestable en soluciones acuosas, ya que reacciona consigo misma mediante una reacción de dismutación (Cadenas, 1989; Fridovich, 1983).

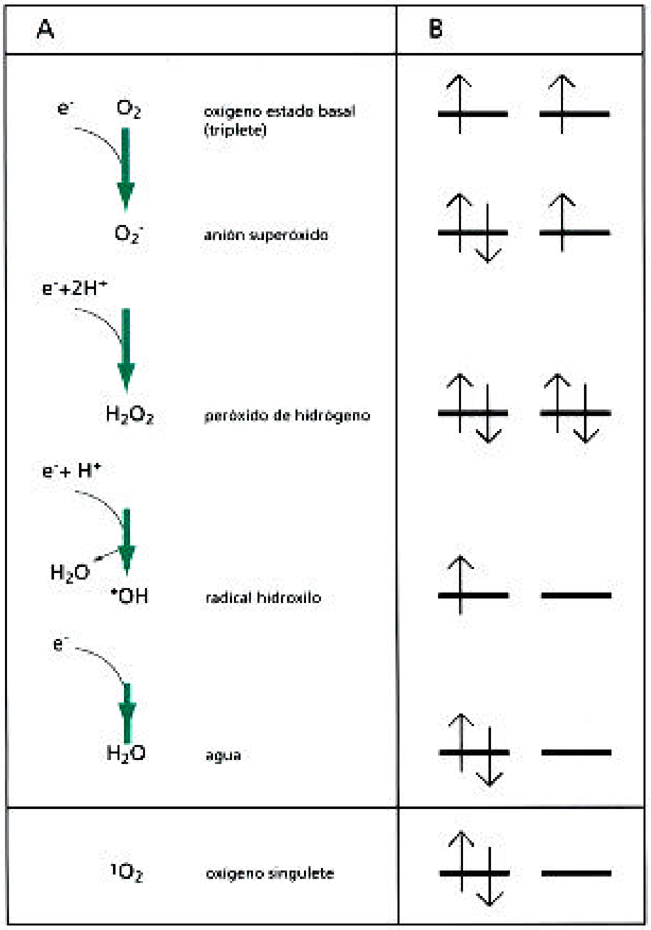


Figura 5. Diferentes transformaciones sucesivas del oxígeno molecular por adición de electrones.

Si son dos electrones los que se incorporan a la molécula de oxígeno se forma el ión peróxido (O_2^{2-}), cuya forma protonada es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este compuesto es peligroso para las células porque es un potente oxidante que atraviesa fácilmente las membranas biológicas y del que se puede originar el radical hidroxilo ($OH^{\cdot}$) (Pryor y Church, 1991). La reducción del oxígeno molecular por tres electrones da lugar al citado radical hidroxilo. Esta especie es una de las más reactivas que se conocen y, por tanto, presenta una semivida y un radio de acción muy cortos (microsegundos y angstroms, respectivamente). Así, un radical hidroxilo formado en la mitocondria será improbable que, por sí mismo, tenga un efecto directo en otras partes de la célula (Pryor, 1986). Una fuente importante de radicales hidroxilo es la reacción de Haber-Weiss que es, a su vez, el balance de dos

reacciones (Halliwell y Gutteridge, 1992) (Figura 6). Finalmente, la reducción tetravalente del oxígeno molecular origina una molécula de agua.

$$O_2^{-\cdot} + Fe^{3+} \longrightarrow O_2 + Fe^{2+}$$
$$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow \cdot OH + OH^- + Fe^{3+}$$
$$\overline{O_2^{-\cdot} + H_2O_2 \longrightarrow \cdot OH + OH^- + O_2}$$

Figura 6. Reacción de Haber-Weiss mediante la cual se generan radicales hidroxilo.

5. REACTIVIDAD DE LOS RADICALES LIBRES DE OXÍGENO

La mayoría de los radicales libres de interés biológico suelen ser extremadamente reactivos e inestables, por lo que tienen una semivida muy corta, que se puede medir incluso en fracciones de microsegundo. No obstante, cuando un radical libre reacciona con un compuesto no radical pueden formarse otros radicales libres, de manera que es posible que se creen reacciones en cadena y den lugar a efectos biológicos lejos del sistema que originó el primer radical. Un ejemplo lo constituye la peroxidación de lípidos (Harman, 1992; Webster y Nunn, 1988).
Las proteínas, los lípidos insaturados, los ácidos nucleicos y los carbohidratos son los blancos fundamentales de las reacciones de los radicales libres. A continuación, se describen los daños que pueden sufrir estas moléculas debido a los radicales libres.

Proteínas

Las proteínas son modificadas de diferente manera por las especies reactivas de oxígeno. Los radicales libres de oxígeno, por ejemplo, pueden reaccionar directamente con el ligando metálico de muchas metaloproteínas. Se ha comprobado que el hierro de la oxihemoglobina puede reaccionar con el radical superóxido o el peróxido de hidrógeno para formar metahemoglobina (Freeman y Grapo, 1982). Otra importante hemoproteína citoplasmática, la catalasa, es inhibida por el $O_2^{\cdot -}$, que la convierte en sus formas inactivas ferroxi y ferrilo (Kono y Fridovich,

1982). Por último, el peróxido de hidrógeno producto de la dismutación del $O_2^{\cdot -}$, también puede reducir el Cu^{2+} de la superóxido dismutasa CuZn a Cu^{1+}, reaccionando después con él y generando radical hidroxilo. A su vez, este radical hidroxilo ataca un residuo adyacente de histidina del centro activo de la enzima, necesario para la actividad catalítica (Hodgson y Fridovich, 1975).

Debido a la reactividad de los radicales libres con las moléculas insaturadas o que contienen azufre, las proteínas con proporciones elevadas de triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina y cisteína pueden sufrir modificaciones de sus aminoácidos mediadas por radicales libres. En este sentido, se ha observado que enzimas tales como la papaína, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa e incluso la superóxido dismutasa, que dependen todas ellas de dichos aminoácidos para desarrollar su actividad, sufren también alteraciones en su estructura proteica, que dan lugar a entrecruzamientos y fenómenos de agregación, que se ven favorecidos por la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares (Freeman y Grapo, 1982; Gebicki y Gebicki, 1993; Stadtman, 1992; Webster y Nunn, 1988; Wolpp et al., 1986).

Los enlaces peptídicos también son susceptibles de ser atacados por los radicales libres. Estos enlaces pueden romperse tras la oxidación de residuos de prolina por radicales hidroxilo o superóxido (Wolff y Dean, 1986).

Finalmente, la reacción de los radicales libres con las proteínas también puede generar subproductos que amplificarían el daño inicial. Un ejemplo lo constituye la oxidación del triptófano hasta H_2O_2 y N-formil kinurenina (Freeman y Grapo, 1982; Nielsen, 1981; Stadtman, 1992).

Lípidos

Los radicales libres hidroxilo e hidroperoxilo y el oxígeno singulete pueden reaccionar con los ácidos grasos de los fosfolípidos y otros componentes lipídicos de las membranas para formar hidroperóxidos lipídicos. (Aikens y Dix, 1991; Choe et al., 1995; Gutteridge y Halliwell, 1990). Este proceso de peroxidación lipídica comienza cuando el radical libre quita un átomo de hidrógeno de uno de los carbonos metilenos de la cadena carbonada para formar un radical libre lipídico ($L^{\cdot}$). Los ácidos grasos poliinsaturados de membrana son especialmente susceptibles de

ser atacados por radicales libres, puesto que contienen grupos metilenos separados por dobles enlaces que debilitan el enlace C-H metileno. Cuando el radical lipídico se origina, sufre inmediatamente un reajuste molecular, produciéndose un dieno conjugado que puede reaccionar con el O_2 y formar un radical hidroperoxilo. Este radical libre da lugar a endoperóxidos, o bien puede tomar un átomo de hidrógeno de un carbono metileno de otro ácido graso poliinsaturado adyacente para formar, de nuevo, un radical libre lipídico y un hidroperóxido (Figura 7).

El radical lipídico se combina con otra molécula de oxígeno y así se establece una cadena de propagación del daño oxidativo. Por su parte, el hidroperóxido, que es un compuesto estable, si entra en contacto con iones metálicos de transición, producirá más radicales libres que iniciarán y propagarán otras reacciones en cadena.

Así, las membranas resultan seriamente dañadas y, por tanto, su funcionalidad se ve alterada (Rice-Evans y Burdon, 1993).

Los productos finales del proceso de peroxidación lipídica, entre los que se incluyen hidrocarburos volátiles, alcoholes o aldehídos, pueden difundir lejos del lugar donde se originaron y causar edema e influir en la permeabilidad vascular, inflamación y quimiotaxis (Blake et al., 1987; Pryor y Church, 1991). Estos productos pueden también alterar la actividad fosfolipasa e inducir la liberación de ácido araquidónico y la subsiguiente formación de prostaglandinas y distintos endoperóxidos (Sevanian et al., 1981).

El malondialdehído, que es otro producto final de la peroxidación de ácidos grasos con tres o más dobles enlaces, puede causar entrecruzamientos y polimerización de distintos componentes de la membrana (Nielsen, 1981; Valenzuela, 1991). Así pues, las propiedades de las membranas aún resultan más dañadas.

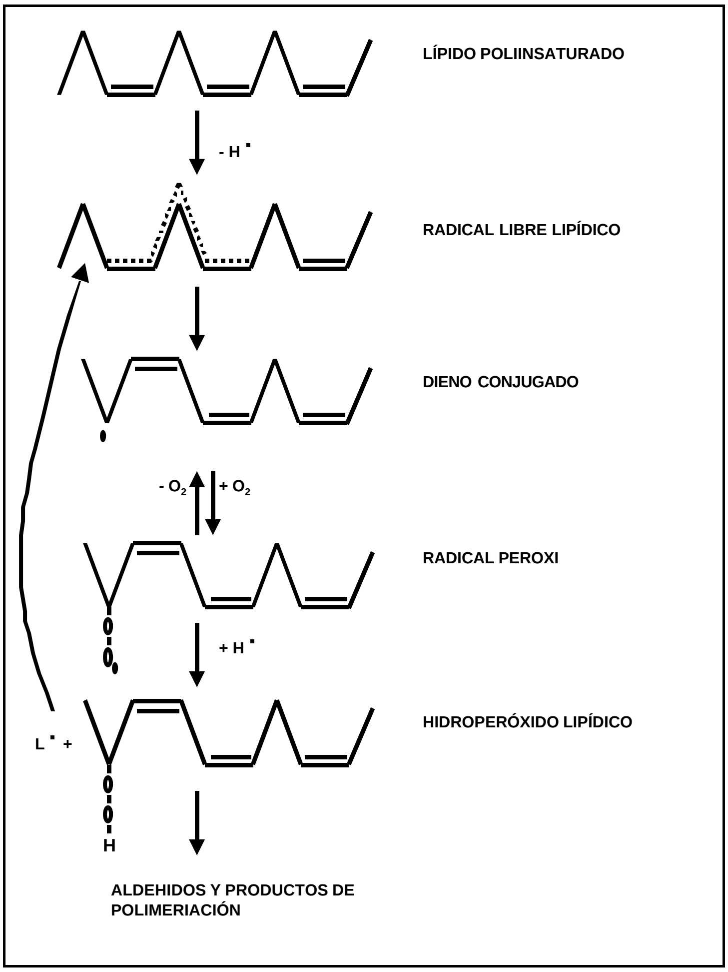


Figura 7. Reacciones de la peroxidación lipídica.

Ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos también pueden ser atacados por los radicales libres. Realmente la citotoxicidad de estas especies químicas, en gran parte, es una consecuencia de las aberraciones cromosómicas producidas por las modificaciones químicas que sufren las bases y los azúcares del DNA al reaccionar con los radicales libres, especialmente con el $OH^{.}$ (Harman, 1992; Randerath et al., 1992; Higuchi y Linn, 1995). Las modificaciones químicas de los nucleótidos provocan, en muchos casos, la ruptura de hebras del DNA. Si el daño que se origina es tan grande que no puede ser reparado, se produce una mutación, o bien la célula muere (Cerutti, 1985; Davies et al., 1990; Demple, 1990).

Carbohidratos

Los carbohidratos son dañados por los radicales libres en menor proporción que otras moléculas. Azúcares tales como la glucosa, el manitol o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el radical $OH^{\cdot}$ para producir sustancias reactivas (Blake et al., 1987; Sies, 1985). Asimismo, los polisacáridos pueden sufrir el ataque de los radicales libres, en este caso fragmentándose a unidades más sencillas. Greenwald y Moy (1980) han demostrado que el ácido hialurónico se despolimeriza en presencia de concentraciones elevadas de radicales hidroxilo, provocando un descenso de la viscosidad del líquido sinovial de las articulaciones.

A pesar de que los radicales libres son especies extremadamente reactivas, las células disponen de sistemas de protección frente a ellos. De hecho los radicales libres se están produciendo continuamente en el organismo (Freeman y Grapo, 1982; Halliwell, 1989), el problema sólo surge cuando hay una sobreproducción o cuando los sistemas antioxidantes, que comentaremos con posterioridad, están debilitados.

6. SISTEMAS ENDÓGENOS DE PROTECCIÓN DE LA PIEL FRENTE A LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA

Podemos diferenciar dos mecanismos de protección de la piel en función de si son preventivos de la lesión o si son reparadores de los efectos de la lesión:

<u>MECANISMOS PREVENTIVOS</u>

- *Físicos: pelos (queratina), lípidos de la superficie epidérmica.*

La queratina y los lípidos de la superficie de la epidermis actúan como una barrera física, que mediante un fenómeno de reflexión impiden que un porcentaje importante de la radiación ultravioleta incida sobre las células de la epidermis.

- *Químicos o debidos a cromóforos endógenos: ácido urocánico y melanina*

La melanina está considerada como el factor de protección fisiológico más importante y realiza su acción absorbiendo la radiación entre los 300 y los 1200 nm. Hay dos tipos importantes de melanina, la *eumelanina* de color negro y la *pheomelanina*, de color rojizo (Figura 8). La *eumelanina* tiene su máximo espectro de absorción en los 300 nm. La *pheomelanina* está presente en proporciones importantes en los individuos pelirrojos y su capacidad filtrante es poco significativa.

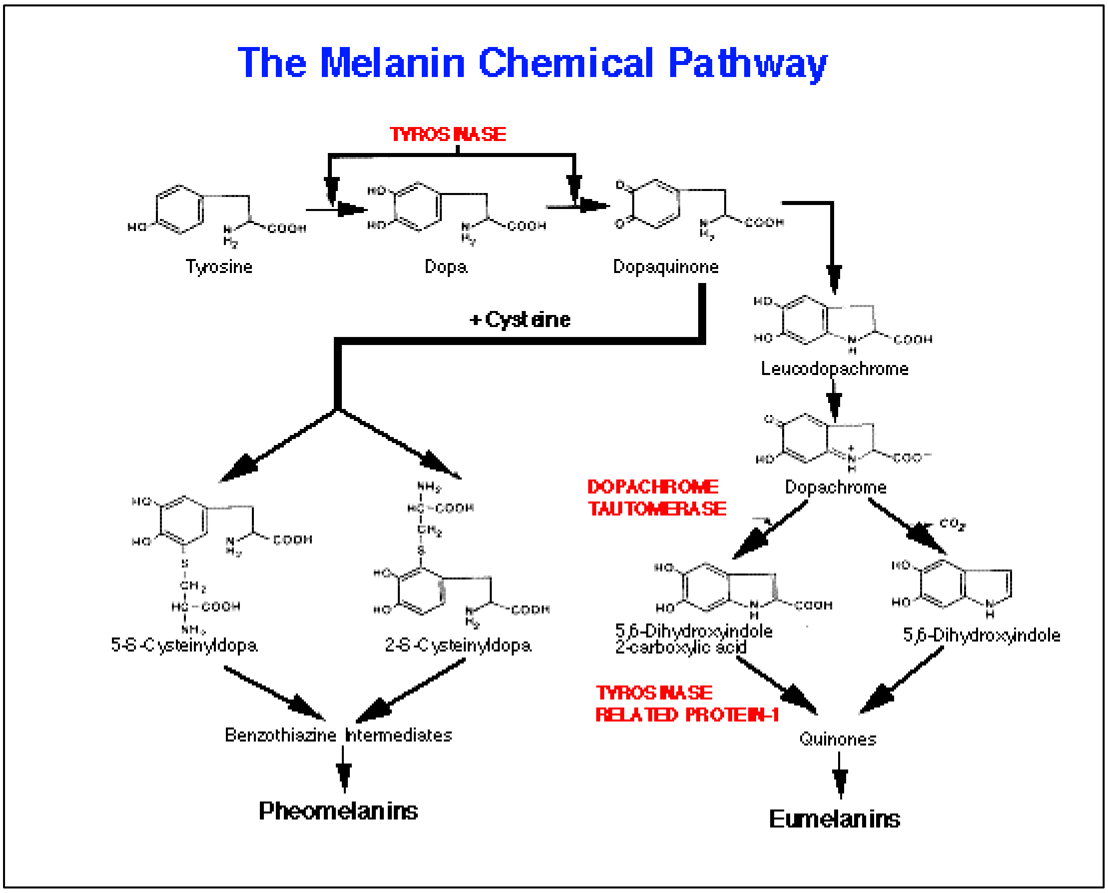


Figura 8. Síntesis de los diferentes tipos de melanina a partir de la tirosina.

La radiación UVB tiene una marcada acción pigmentógena, que se lleva a cabo mediante tres mecanismos:

1. Estimula la formación de nuevo pigmento en el melanocito.
2. Produce una mayor y más rápida transferencia de dicha melanina a los queratinocitos.
3. Realiza una acción proliferante sobre los propios melanocitos.

La banda UVB de máxima acción pigmentógena es la de longitud de onda de 300 a 320 nm. La pigmentación empieza a ser visible a los tres o cuatro días de la primera exposición y, si ésta es aislada, llega a su máximo al cabo de 15 días, perdiéndose posteriormente con mucha lentitud. En exposiciones reiteradas, el efecto pigmentógeno se acumula, alcanzándose una mayor resistencia de la piel al sol.
La pigmentación por UVA empieza prácticamente de forma inmediata pero mucho menos acentuada; no hay neoformación de melanina sino tan sólo oxidación de la preexistente y una mayor transferencia de este pigmento a los queratinocitos. La pigmentación por UVA es mucho más transitoria, perdiéndose a los pocos días.

La respuesta de la piel frente la exposición solar no es uniforme en todos los individuos y razas, esto ha llevado a la clasificación de los individuos en fototipos cutáneos, que se establecen en función de la respuesta de la piel después de la exposición a la luz solar del mediodía durante 45 minutos. (Tabla 1)

Fototipo I Siempre se queman y nunca se pigmentan
Fototipo II Siempre se queman y se pigmentan ligeramente
Fototipo III Casi nunca se queman y se pigmentan de forma gradual
Fototipo IV Nunca se queman y siempre se pigmentan
Fototipo V Razas pigmentadas
Fototipo VI Raza negra

Tabla 1. Fototipos cutáneos según la clasificación de Fitzpatrick. (Fitzpatrick, 1988)

Desde un punto de vista práctico, las personas pueden dividirse en dos grandes grupos: los melanocomprometidos (fototipos I-III) y los melanocompetentes (fototipos IV-VI) (Figura 9).

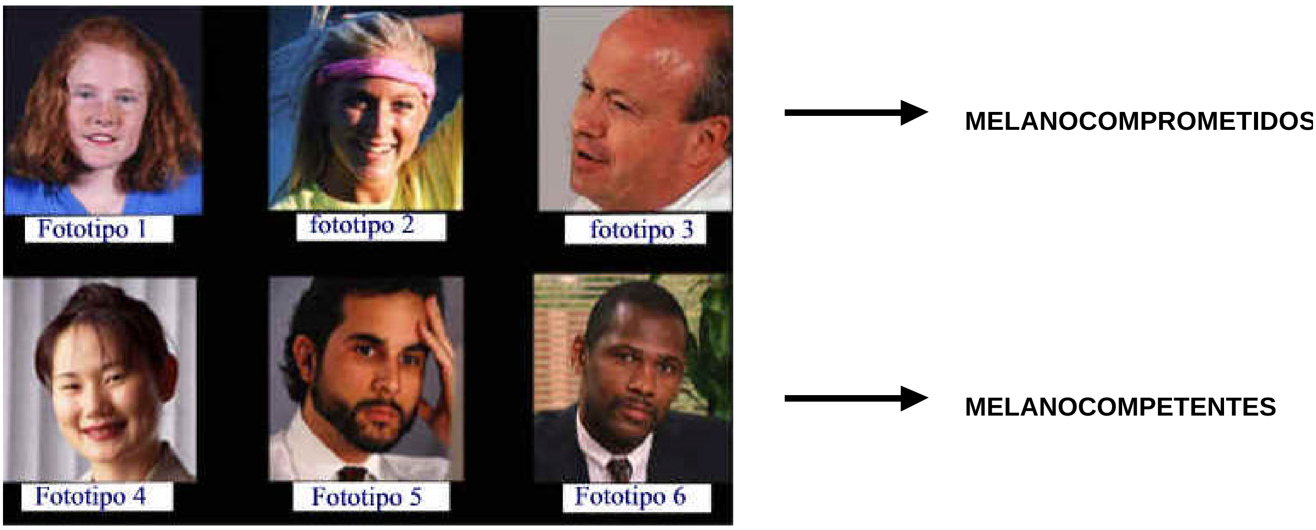


Figura 9. Clasificación de los diferentes fototipos cutáneos en función de su patrón de melanina.

A pesar de la actuación de estos "filtros naturales", continúa llegando una cierta proporción de UVB a la dermis superficial. Los UVA son insensibles a estos filtros, transmitiéndose a través de la epidermis y alcanzando una mayor profundidad en la dermis. Las energías correspondientes al espectro de la luz visible y de la radiación infrarroja tienen aún más capacidad de penetración.

- *Inmunológicos: Células de Langerhans*

Las CL son el principal componente del sistema inmune en la piel. Actuarían como "centinelas" epidérmicos encargados de velar por la salud cutánea, y cuando ésta se viese alterada, informar a otros sistemas para provocar la reacción inmunitaria adecuada (Toews et al., 1980).

MECANISMOS REPARADORES

- *Genéticos.*

La reparación por escisión de los dímeros de pirimidina provocados por la radiación ultravioleta es un ejemplo de mecanismo genético. La importancia de estos mecanismos de reparación queda patente en el caso de una enfermedad como es el *Xeroderma Pigmentosum.* Los individuos que padecen esta enfermedad presentan una deficiencia de los mecanismos de reparación de las lesiones que la radiación ultravioleta provoca en la piel; como triste consecuencia de este hecho, estas personas presentan una tasa de mortalidad a los 40 años de un 70%, como consecuencia de cánceres cutáneos (Cleaver y Bootsma, 1975; Dumaz, 1993).
Otra forma de "reparar" la lesión del DNA producida por la radiación ultravioleta, de extrema importancia, es la muerte celular programada o apoptosis.
Ambas estrategias previenen la evolución de las mutaciones, impidiéndose así el posible proceso de transformación celular y consiguiente carcinogénesis (Soehnge et al., 1997).

- *Antirradicalares: Sistema defensivo antioxidante*

El organismo dispone de toda una serie de mecanismos para neutralizar la acción de los radicales libres generados, en este caso, por la radiación ultravioleta.

1. Glutatión (GSH): Es un componente no enzimático del sistema defensivo antioxidante. Es un tripéptido endógeno compuesto por ácido glutámico, cisteína y glicina (Figura 10).

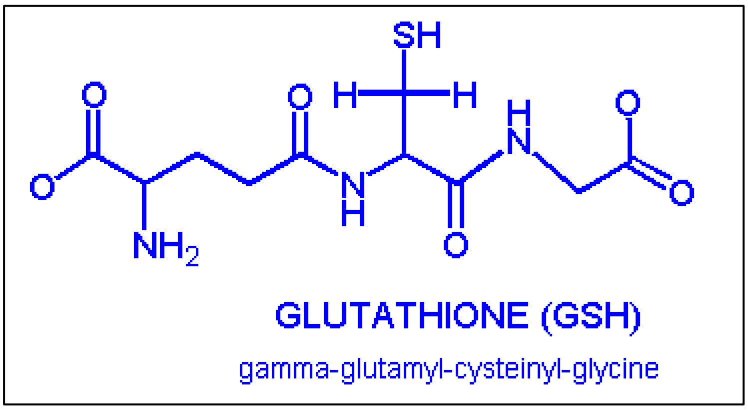


Figura 10. Estructura química del glutatión (GSH).

Juega un papel central en la defensa celular contra el daño oxidativo. Una disminución en el GSH de un cultivo de células epidérmicas humanas, las hace sensibles a las mutaciones causadas por las radiaciones UVA y UVB, con la consiguiente muerte celular (Tyrrell y Pidoux, 1986; Tyrrell y Pidoux, 1988). El GSH puede actuar directamente como un "scavenger" o limpiador y se cree que éste es el efecto protector más potente contra la radiación UVB (Tyrrel et al., 1991).

El GSH neutraliza los radicales libres mediante la donación de un átomo de hidrógeno, y el resultante radical tiol, mucho menos reactivo, decae o degenera biomolecularmente o a través de un mecanismo dependiente del oxígeno, en ambos casos formando glutatión oxidado (GSSG) (Ross et al., 1987). Además, el GSSG puede neutralizar radicales libres por donación de electrones (Prutz, 1989).

En relación a la radiación UVA, el GSH es especialmente importante ya que es el único donador de hidrógeno en la neutralización de H_2O_2 catalizada por la glutatión peroxidasa (GPx) (Tyrrell et al., 1991). El GSH puede también actuar como donador de hidrógeno para varios antioxidantes endógenos como el ascorbato. En este sentido, puede potenciar la eficacia en la protección llevada a cabo por una amplia variedad de mecanismos endógenos que son activos frente a diferentes reactivos intermediarios.

En el sistema de fotoprotección epidérmico, la disponibilidad de suficiente glutatión reducido (GSH) es absolutamente esencial.

El glutatión oxidado (GSSG) es reciclado por la glutatión reductasa (GR), utilizando NADPH como donador de hidrógeno.

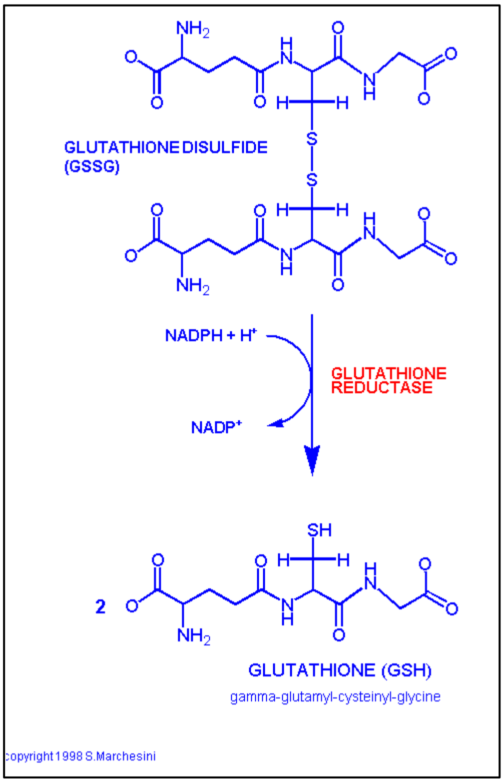


Figura 11. Recuperación de los niveles de GSH a partir de GSSG por parte de la glutatión reductasa (GR).

La actividad de GR en la piel es extremadamente alta y se ha estimado que el tiempo necesario para reciclar todo el GSH cutáneo es inferior a un minuto (Connor y Wheeler, 1987). Esta increíble sobrecapacidad da una idea de la importancia del mantenimiento de los niveles mínimos de GSH en la piel.

La fundamental posición del GSH como eje en la defensa contra la oxidación, hace que dicho compuesto sea el centro de atención a la hora de intentar conseguir una estimulación de la fotoprotección endógena.

2. Superóxido dismutasa (SOD)

La SOD es una enzima que cataliza la reducción del anión superóxido, producido como producto resultante de la fosforilación oxidativa, o bien derivado de la radiación UV y durante la inflamación, transformándolo en un producto menos reactivo como es el H_2O_2. La glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa (CAT) seguidamente descomponen este H_2O_2.

La SOD está presente en la piel en diferentes formas: SOD cobre/zinc (Cu/Zn-SOD) y la SOD manganeso (Mn-SOD) (Vessey, 1993). La Cu/Zn-SOD se encuentra en el citosol, tiene un peso molecular de 32 KDa con dos subunidades idénticas. La Mn-SOD se localiza en la matriz mitocondrial y tiene un peso molecular de 88 KDa con cuatro subunidades idénticas. La Mn-SOD actúa como primera línea de defensa en la detoxificación del anión superóxido y parece estar implicada en procesos como la supresión tumoral o la diferenciación celular (Church et al., 1993; Akashi et al., 1995).

La aplicación tópica de una crema que contiene SOD es efectiva contra varias afecciones asociadas con el aumento en la producción de ERO (Mizushima et al., 1991).

Irradiaciones puntuales y repetitivas con bajas dosis de UVA a fibroblastos dérmicos humanos "in vitro" dió lugar a un aumento significativo de Mn-SOD, tanto en los niveles de mRNA como de proteínas, y esta inducción produjo una protección sustancial frente al efecto citotóxico de la agresión por UVA (Poswig et al., 1999).

3. Glutatión peroxidasa (GPx)

La GPx es una selenoproteína tetramérica con una selenocisteína en cada uno de los cuatro centros activos (Wendel et al., 1978; Gunzler et al., 1984). Es una enzima intracelular ubicua que utiliza los peróxidos lipídicos como substrato. La GPx cataliza la conversión del H_2O_2, inducida por la RUV, en agua y oxígeno, usando GSH como

cofactor. La GPx reduce los peróxidos lipídicos tóxicos a compuestos menos tóxicos utilizando GSH.

Existen dos formas de GPx, la selenio dependiente y la selenio independiente. La GPx selenio dependiente muestra una alta reactividad tanto frente al H_2O_2 como frente a hidroperóxidos orgánicos. Se encuentra tanto en el citosol como en las mitocondrias.

Una deficiencia en selenio determina una disminución de la actividad GPx en la piel, un incremento en la carcinogénesis en ratones inducida por la radiación UVB (Pence et al., 1994) y un incremento en la lipoperoxidación lipídica inducida por UVA en fibroblastos en cultivo (Moysan et al., 1995).

4. Catalasa (CAT)

La CAT cataliza la conversión del H_2O_2 en agua y oxígeno molecular reduciendo, en consecuencia, los efectos dañinos del H_2O_2.

El H_2O_2 es producida in vivo como consecuencia normal del metabolismo celular o como consecuencia de la actividad de agentes oxidantes; pero el ritmo de generación de este producto se incrementa de forma extrema tras la exposición a la radiación UV.

A pH fisiológico, la larga semivida del H_2O_2, su capacidad para atravesar bicapas lipídicas y su reactividad con membranas o proteínas unidas a Fe^{2+}, hace que dicho compuesto sea una forma extremadamente peligrosa de oxígeno activado (Liochev y Fridovich, 1994; Hoffschir et al., 1998).

El H_2O_2 es un compuesto tóxico per se, pero probablemente sólo a concentraciones que excedan las concentraciones intracelulares normales (Fridovich, 1977). Por otro lado, los hidroperóxidos reaccionan con metales de transición parcialmente quelados, formando especies radicalares muy reactivas, como los radicales hidroxilo y alcoxilo, a través de una reacción de Fenton.

Una concentración intracelular elevada de H_2O_2 puede ser el resultado de una concentración elevada de anión superóxido (Nohl et al., 1981).

La capacidad de las células para eliminar el H_2O_2 se ve comprometida por la disminución de la actividad CAT inducida por la luz ultravioleta/visible. El mecanismo

de inactivación es probablemente la descomposición, dependiente del oxígeno, de uno de los cuatro anillos de porfirina (Aronoff, 1965).

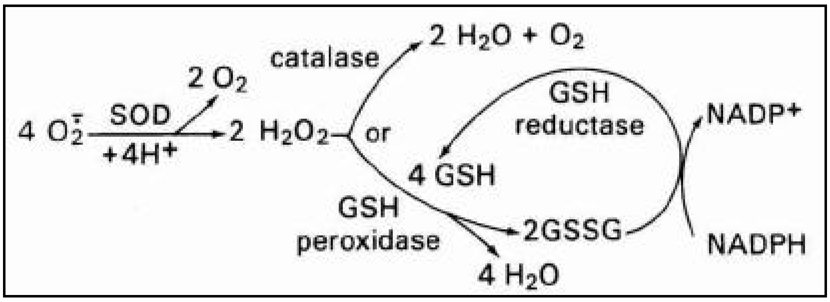


Figura 12. Intervención coordinada de los diferentes mecanismos enzimáticos para detoxificar los radicales libres.

5. Glutatión-S-transferasa (GST)

Las GST son enzimas miembros de una familia de supergenes. Se encuentran tanto en el citosol como en la mitocondria (Sun, 1990) y juegan un papel primordial en la detoxificación de productos derivados del estrés oxidativo, incluyendo los hidroperóxidos de DNA (Hayes y Strange, 1995).

Se considera que la formación de especies reactivas del oxígeno es la responsable de los efectos nocivos de la radiación ultravioleta sobre la piel. Como ya sabemos, los efectos de la radiación ultravioleta implican daños moleculares con la consecuente inflamación, mutagénesis y genotoxicidad (Halliwell y Arouma, 1991; Darr y Fridovich, 1994). Además, sabemos que las radiaciones UVA y UVB tienen diferentes efectos sobre el DNA. La radiación UVA, predominantemente de forma indirecta, produce daño en el DNA a través de los radicales libres, produciendo rupturas en la cadena de DNA y formación de lesiones premutagénicas de 8-hidroxiguanina (Peak et al., 1987; Audic y Giacomoni, 1993). En cambio, la radiación UVB induce directamente la formación de uniones covalentes entre bases pirimidínicas adyacentes, generando fotoderivados como los dímeros de ciclopirimidina (T/T) y lesiones pirimidina-pirimidina (6-4) (Setlow, 1966). Estos productos resultan mutagénicos si no son reparados (Setlow, 1978).

El papel de la GST se observó inicialmente respecto a la catalización del primer paso en la formación del ácido mercaptúrico (Habig et al., 1974). Pero se sabe que,

además, la GST contribuye a la protección frente al estrés oxidativo, tanto mediante la inactivación directa de peróxidos (de los lípidos o del DNA) como mediante la detoxificación de xenobióticos, los cuales son conocidos cofactores para la formación de radicales libres (Ketterer y Meyer, 1989; Berhane et al., 1994).

Las GST catalizan la conjugación de los productos electrofílicos con el glutatión reducido, y se dividen en cinco clases, (i) α (GST A), (ii) μ (GST M), (iii) π (GST P), (iv) θ (GST T), y (v) ξ (GST Z) (Mannervik et al., 1992; Board et al., 1997). Se han hallado alelismos en los genes de las familias α, μ, θ y π. Las isoenzimas codificadas por estos genes catalizan la detoxificación de varios compuestos tóxicos y mutagénicos incluyendo epóxidos que resultan del metabolismo de hidrocarburos policíclicos aromáticos, mediados por el citocromo P450, así como la detoxificación de lípidos y productos del DNA derivados del estrés oxidativo (Hayes y Strange, 1995; Smith et al., 1995).

Las GST están distribuidas ampliamente por todo el organismo, y su aparición en el feto se inicia muy tempranamente durante el proceso de desarrollo (Pacifici et al., 1988). Esto será importante para metabolizar rápidamentre los compuetos extraños, sobre todo en aquellos tejidos que se hallan en los lugares de entrada o de salida del organismo, como son los pulmones o el hígado.

Las formas catiónicas α de la GST se describieron el año 1975 en el hígado humano, y posteriormente se han purificado en muchos otros tejidos: glándulas adrenales, aorta, cerebro, colon, córnea, diafragma, fibroblastos fetales, mucosa gástrica, corazón, íleo, riñón, hígado, pulmón, próstata, piel, intestino, estómago, testículos y útero (Awasthi et al., 1994).

La clase μ se ha identificado en aorta, cerebro, colon, diafragma, corazón, riñón, hígado, pulmón, músculo, páncreas, glándulas salivales, bazo, testículos y útero (Awasthi et al., 1994).

La presencia de las formas π se ha demostrado en aorta, vejiga urinaria, cerebro, mamas, colon, córnea, diafragma, duodeno, mucosa gástrica, corazón, íleo, riñón, pulmón, músculo, placenta, próstata, glándulas salivales, piel, bazo, tiroides, estómago y útero (Awasthi et al., 1994).

Las GST hepáticas tienen una actvidad enzimática claramente superior a la de otros tejidos, como por ejemplo pulmón, riñón, piel, intestino, cápsulas suprarrenales,

bazo, placenta, sangre total y plasma (Strange et al., 1982; Guthemberg y Mannervik, 1981), aunque esto dependerá también del substrato utilizado en la reacción enzimática "in vitro".

Por otro lado, estudios cromatográficos e inmunológicos muestran claramente una cierta expresión específica para cada tipo celular de las isoenzimas de la GST. Por ejemplo, todas las isoenzimas observados en las células sinusoidales hepáticas se detectan también en parénquima hepático, pero en las células de Kupffer y en las endoteliales faltan muchas de las isoenzimas presentes en el parénquima. La importancia de este hecho radica en que, cuando un compuesto xenobiótico entra en la circulación hepática, las primeras células con las que se encuentra son las sinusoidales; por lo tanto, la presencia de muchas isoenzimas capaces de detoxificar una gran variedad de compuestos en las células de Kupffer o en las endoteliales -ambas forman parte de las sinusoidales- podría ser crucial para proteger al hígado del daño provocado por sustancias parcialmente hepatotóxicas (Steinberg et al., 1989).

En el caso de la piel humana, se han identificado en el citosol 6 formas diferentes con punto isoeléctrico (pI) de 4,6, 5,9, 6,8, 7,1, 8,5, 9,9 mediante la técnica del cromatoenfoque. Las tres más abundantes son una ácida de clase π (pI 4,6), una básica de clase α (pI 8,5) y una muy básica de clase α (pI 9,9). Esta última representa 10-20% del total de las GST de piel, con alta actividad glutatión peroxidasa para los hidroperóxidos linolénicos e hidroperóxidos cuménicos (Del Boccio et al., 1987), y se expresa también en próstata humana.

Utilizando anticuerpos policlonales específicos para la GST se han identificado isoenzimas de la clase π, de forma mayoritaria, y también formas α en el citosol de la piel humana (Raza et al., 1991).

La GST π de piel humana y en concreto, de la epidermis, es la misma enzima GSTP1-1 descrita en placenta, y por lo tanto, producto de un mismo gen. (Konohana et al., 1990).

Numerosos estudios describen la actividad GST π, de forma mayoritaria, y α en piel humana normal y en diversas patologías como cáncer de vejiga (Lafuente et al., 1990), carcinoma cutáneo y de células escamosas (Shimizu et al., 1995), en líneas celulares tumorales humanas (Campbell et al., 1991), en metástasis de melanoma y

en melanoma maligno (Peters et al., 1994), en glándulas salivales normales y tumorales (Zieper et al., 1994) y en diversos tumores de piel (Kantor et al., 1991).
Aunque la piel está continuamente expuesta a gran cantidad de moléculas y agentes causantes de daño tisular, se conoce muy poco el papel que pueden jugar las diversas isoenzimas de la GST en el metabolismo de substratos fisiológicos y xenobióticos en el tejido cutáneo.

Desde un punto de vista compartimental podemos establecer dos grupos respecto a los mecanismos expuestos con anterioridad:

A/ En el medio intracelular:

- Enzimas citosólicas que catalizan la eliminación del anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$) y del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), reduciendo al máximo la formación de radical hidroxilo ($^{\cdot}OH$)
- Moléculas con capacidad de fijar y destruir los radicales libres: scavengers (limpiadores)
- Los neutralizadores del oxígeno singulete ($^1O_2$): quenchers (amortiguadores), como el glutatión, la vitamina E, etc.

Scavengers y enzimas son principalmente endocelulares, hecho que deja la piel relativamente desprotegida a causa de la importante presencia de espacio conjuntivo extracelular (Cerimele et al., 1990).

B/ En el medio extracelular:

- El compartimiento extracelular sólo dispone de débiles medidas de protección. Por ello, en las reacciones inflamatorias, el radical superóxido producido por las células fagocitarias activadas ejerce localmente, de una forma casi exclusiva, su potencial tóxico frente a las membranas plasmáticas (Pré, 1991).

En la figura 13 podemos observar el conjunto de los sistemas biológicos de defensa antioxidante y su interrelación.

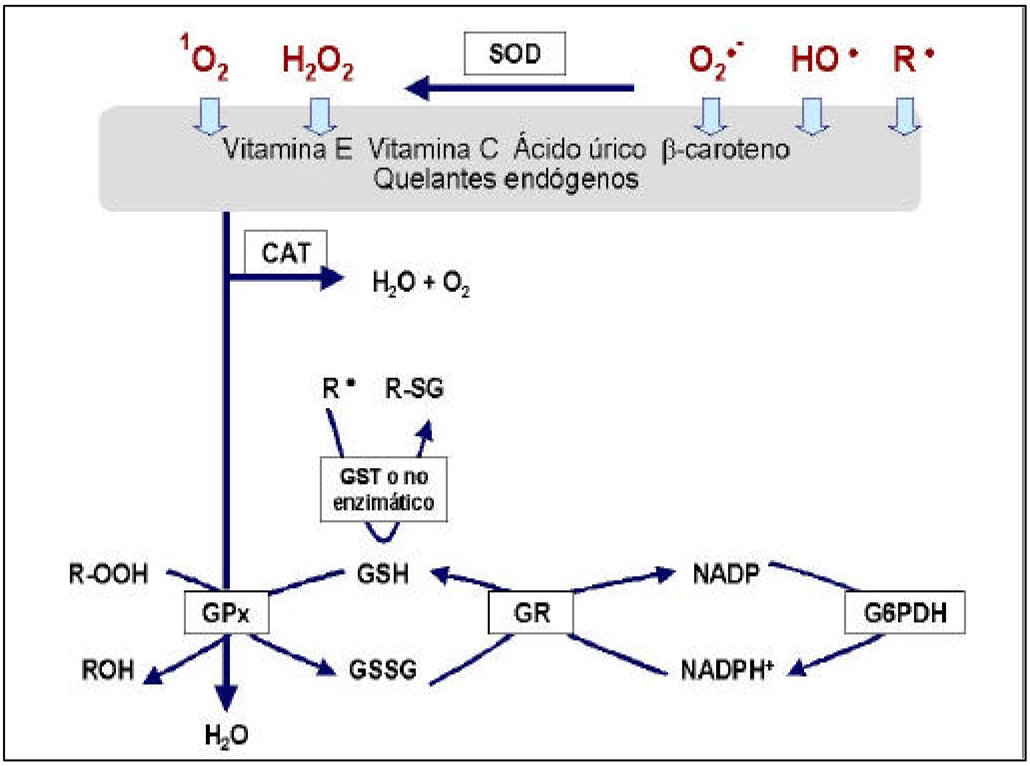


Figura 13. Sistemas biológicos de defensa antioxidante.

7. CÁNCER DE PIEL Y RADIACIÓN ULTRAVIOLETA. EVOLUCIÓN DEL CONOCIMIENTO

La relación entre el cáncer de piel y la exposición a la luz solar se conoce desde finales del siglo XIX, cuando se observó que la aparición de este tipo de neoplasias se producía, en su mayoría, en personas con la piel dañada por el sol (Unna, 1894; Dubreuilh, 1896).

Estudios posteriores a mediados del siglo XX demostraron claramente el papel inductor de la radiación ultravioleta en la aparición del cáncer de piel (Roffo, 1933; Rusch et al., 1941).

Fue en este período cuando se publicó que el proceso de carcinogénesis en la piel era un mecanismo formado por dos etapas (Beremblum, 1954), consistentes en una "iniciación" (una alteración irreversible del ácido desoxirribonucleico) y una "promoción" (la cual es un proceso reversible).

Desde entonces, ha sido claramente demostrado que la radiación ultravioleta tiene la propiedad de ser capaz de actuar como iniciador i/o promotor, es decir, puede actuar como carcinógeno completo (Epstein y Roth, 1968; Pound, 1970).

Los estudios epidemiológicos del cáncer cutáneo empezaron sobre el año 1960. Estos trabajos aportaron una evidencia experimental de la relación entre la exposición solar y el cáncer de piel en humanos, y apuntaron la importancia del fenotipo y el genotipo en la determinación de la susceptibilidad a la fotocarcinogénesis (Urbach, 1969).

Los posteriores estudios se centraron en la respuesta celular a la radiación ultravioleta, trabajando tanto sobre piel humana y de animales de experimentación como en cultivos celulares.

En los años 70 la investigación en fotocarcinogénesis pasó de un nivel celular a un nivel molecular, en gran medida debido a dos influencias: la primera fue el estudio de cómo la radiación ultravioleta producía mutaciones en las bacterias, estudio que abrió las puertas hacia una experimentación en este sentido pero con células animales (Setlow y Setlow, 1972). La segunda influencia fue el descubrimiento que permitió conocer que las células procedentes de pacientes con *Xeroderma Pigmentosum* eran deficientes en la capacidad de reparar las alteraciones en el DNA producidas por la radiación ultravioleta (Cleaver y Bootsma, 1975).

Actualmente, los estudios se centran en comprender los mecanismos moleculares implicados en el proceso de carcinogénesis, como por ejemplo las mutaciones en p53 y *ras*, y en el estudio del proceso de inmunosupresión cutáneo (Soehnge et al., 1997).

8. INDUCCIÓN DEL CÁNCER DE PIEL DEBIDO A LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA

Los queratinocitos epidérmicos son las células de la piel más susceptibles al daño producido por la exposición a la radiación ultravioleta, debido a su localización en la superficie de la piel; por esta razón, la mayoría de los cánceres de piel son de origen epidérmico.

Los sucesos celulares y moleculares que contribuyen al desarrollo de los cánceres de piel, inducidos por la radiación ultravioleta, están formados por una serie de

complejos procesos que incluyen como mínimo dos vías bien diferenciadas, las cuales interactúan o intervienen en la generación de estos tipos de cáncer.

Estas vías o procesos son:

1. Acción directa y/o indirecta de la radiación ultravioleta sobre las células diana (queratinocitos) en el proceso de transformación neoplásica, poniéndose de manifiesto en los sucesos moleculares que ocurren en las células después de la exposición a la radiación ultravioleta:

    - Daño en el DNA
    - Inducción de p53 y proteínas reguladas por p53
    - Parada del ciclo celular
    - Errores en la reparación del DNA y/o replicación
    - Mutaciones en p53 y otros genes

2. Efectos de la radiación ultravioleta sobre el sistema inmune del huésped (células de Langerhans)

Así pues, la radiación ultravioleta que llega a la superficie terrestre interviene en el desarrollo del cáncer cutáneo de dos maneras. Por un lado, provocando mutaciones en el DNA de los queratinocitos, a las que se asociarán las posteriores deficiencias en la reparación de estas alteraciones genéticas, las cuales finalmente dan lugar a un crecimiento no controlado y a la formación del tumor (Figura 14). Y por otro lado, la radiación ultravioleta tiene marcados efectos sobre el sistema inmune, produciendo una situación de inmunosupresión relativa que evita el rechazo del tumor (Figura 15).

El primer estadío de iniciación tumoral viene determinado por una única mutación inducida por la radiación ultravioleta en p53 y, a partir de aquí, se produce la expansión clonal de las células premalignas. La proliferación tumoral se caracteriza por un aumento en la proliferación celular en la que se produce un papiloma escamoso benigno o una queratosis actínica. En ausencia de más exposiciones a la

radiación ultravioleta, ello puede producir mutaciones adicionales y dar lugar a cambios celulares del tipo aneuploide, alteraciones cromosómicas y displasia citológica. Este estadío incluye diversos ciclos de selección y puede ser un factor limitante en la carcinogénesis dado que la mayoría de las mutaciones son deletéreas para las células. La conversión maligna a carcinoma escamoso representa la etapa final, sucediendo espontáneamente en el 5% de los papilomas o lesiones premalignas.

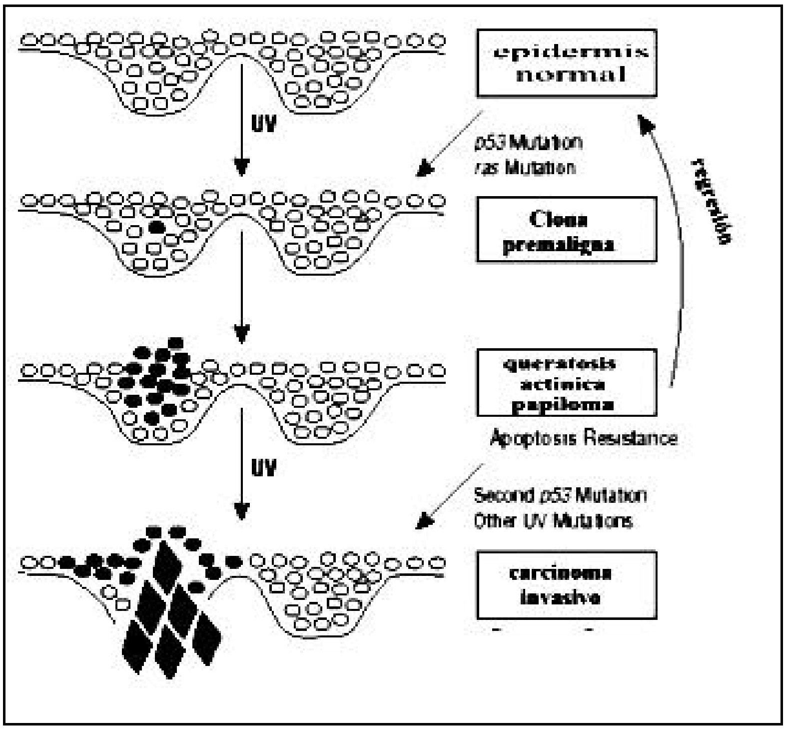


Figura 14. Modelos de los diversos estadíos de desarrollo tumoral en el cáncer cutáneo (Alam y Ratner, 2001).

Como podemos observar en la figura 15, la radiación ultravioleta altera la función de presentación antigénica de las células de Langerhans y produce un influjo de otro tipo de células inflamatorias; la radiación ultravioleta también facilita la producción de citocinas por parte de los queratinocitos. Estos fenómenos inhiben el desarrollo de linfocitos Th1 y facilitan el desarrollo de linfocitos Th2, dando lugar a la supresión de la inmunidad celular.

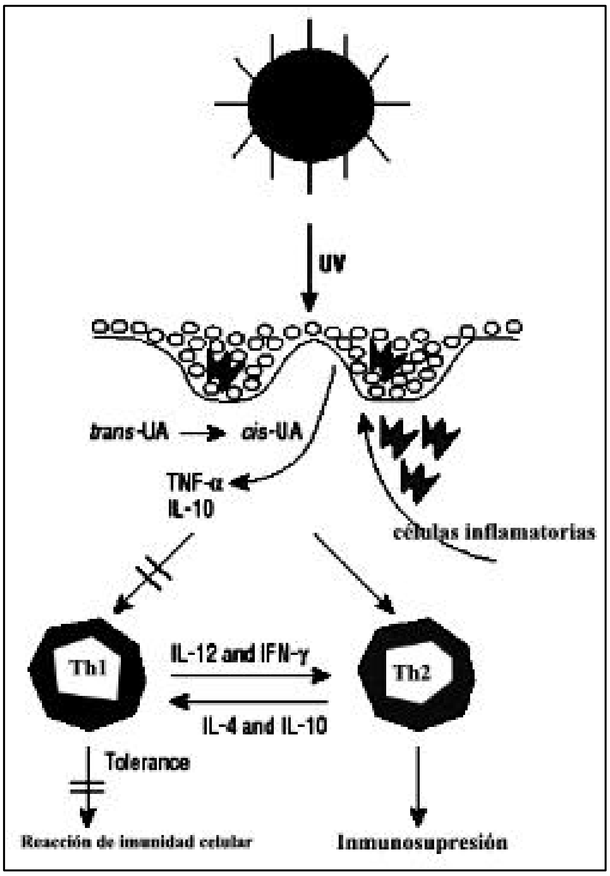


Figura 15. Mecanismo por el que se ve afectado el sistema inmune del huésped debido a la radiación ultravioleta (Alam y Ratner, 2001).

9. PROCESO DE INMUNOSUPRESIÓN CUTÁNEA

El inicio del conocimiento de este fenómeno se debió a la observación de una inusual propiedad de los cánceres de piel inducidos por la radiación UV, según la cual éstos son rechazados cuando se transplantan a ratones no irradiados de la misma cepa, y en cambio no son rechazados en animales irradiados (Kripke, 1974). ¿A qué se debe este peculiar comportamiento?

Para responder a esta pregunta se diseñó el siguiente esquema experimental: extirpar un trozo de tumor del huésped primario irradiado y volverlo a implantar en la zona ventral no irradiada (Figura 16). Los resultados obtenidos fueron que los tumores crecían progresivamente en los huéspedes primarios.

Estos resultados indicaban que el huésped primario tiene una alteración sistémica que interfiere en el rechazo del tumor. Además, esta propiedad era aplicable no sólo a su propio tumor, sino a cualquier tumor inducido por la radiación ultravioleta.

La siguiente cuestión importante era, en qué momento a lo largo del proceso de carcinogénesis, el ratón perdía su capacidad de rechazo. Se halló que ya muy temprano, tan sólo después de pocos meses del inicio del tratamiento, aparecían cánceres primarios en la piel. Por otro lado, después de diversas semanas el ratón ya pierde la capacidad de rechazar el tumor (Kripke y Fisher, 1976).

La conclusión que se desprendió de estos resultados es que la exposición de los ratones a la radiación ultravioleta produce una alteración sistémica que incapacita el rechazo de cánceres de piel, y esta alteración precede a la aparición de este cáncer.

Para demostrar la naturaleza sistémica de esta alteración inmunológica, se inyectó una suspensión de células tumorales en ratones irradiados y no irradiados. El estudio histológico posterior de los pulmones de estos ratones reveló la presencia de metástasis en los ratones irradiados que contrastaba con una ausencia de dichas metástasis en los ratones no irradiados (Kripke y Fidler, 1980).

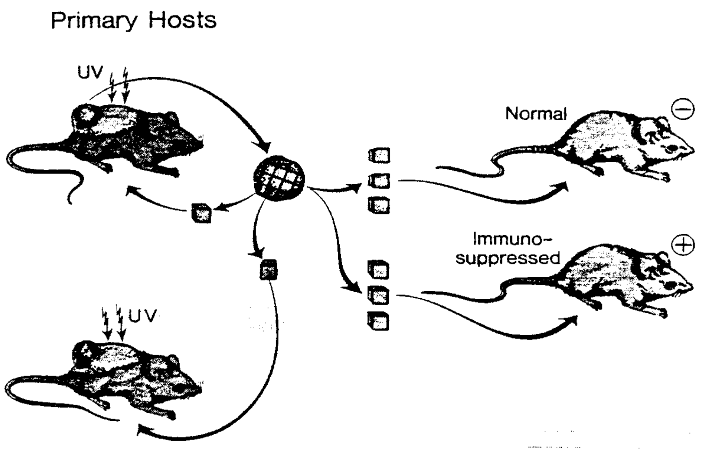


Fig. 1. Experimental protocol used to determine whether the primary host is systemically or locally unresponsive to ultraviolet-induced skin cancers. Transplantation of tumor fragments into normal syngeneic mice results in tumor rejection, but transplantation into immunosuppressed mice results in tumor growth. Transplantation back into the primary host or into a second primary host also results in progressive tumor growth, indicating that their inability to reject skin cancers is a systemic phenomenon.

Figura 16. Demostración experimental de la ausencia de rechazo del tumor por parte de los animales irradiados (Kripke, 1986).

Pero, ¿cúal era la naturaleza de esta alteración sistémica?

Se demostró mediante diversos tests inmunológicos que estos ratones eran inmunológicamente competentes en muchos aspectos, pero que eran deficientes en la generación de reacciones alérgicas por contacto y en su capacidad para rechazar los cánceres de piel inducidos (Kripke, 1981). Por lo tanto, esta alteración era altamente selectiva.

¿Era esta alteración de tipo inmunológico?

Si lo era, tenía que ser transferible por medio del suero o de las células inmunes. Para demostrarlo se utilizaron ratones totalmente inmunosuprimidos por rayos X, a los cuales se les había restablecido el sistema linfocitario, transfiriendo linfocitos procedentes de animales no irradiados con UV, en un caso, y de ratones inmunodeficientes que habían sido sometidos a radiación UV, en otro.

Cuando a estos animales se les transplantaba un tumor de piel inducido por radiación ultravioleta, se observaba que, en aquellos animales que tenían linfocitos procedentes de ratones no irradiados se producía el rechazo del tumor, mientras que esto no sucedía en el caso de los ratones que poseían linfocitos provenientes de animales irradiados con UV.

Por lo tanto, la alteración sistémica producida por la radiación ultravioleta era inmunológica porque ésta podía ser transferida por células linfoides.

El siguiente paso fue plantearse si el fallo de las células linfoides procedentes de animales irradiados en el rechazo del tumor era debida a la ausencia de un efector o a la presencia de células supresoras.

Se demostró que se trataba de un mecanismo supresor, ya que cuando a los animales inmunosuprimidos por rayos X se les restablecía la población linfocitaria con una mezcla de linfocitos procedente tanto de animales irradiados con UV como de animales no irradiados, se observaba que eran también incapaces de rechazar el tumor transplantado (Fisher y Kripke, 1977).

Además, de forma paralela, se había demostrado que la inyección de linfocitos T procedentes de un ratón irradiado con UV a un animal no irradiado, lo hacía incapaz de rechazar los tumores inducidos por UV (Daynes y Spellman, 1977).

Gracias a estos conocimientos se pudieron deducir las tres características importantes de los efectos de la radiación ultravioleta: sistémica, selectiva y supresora.

Trabajos posteriores demostraron que la radiación ultravioleta no sólo afectaba a la capacidad de rechazar los tumores que ella misma provoca, sino también que tenía un efecto importante respecto al desarrollo de los cánceres primarios de piel. Esto se consiguió comparando la inducción de cánceres de piel por mutágenos (no UV) en la zona dorsal de ratones, con y sin irradiación previa en la zona ventral. Se demostró una inducción muy superior de cánceres en aquellos animales previamente irradiados (de Gruijl y van der Leun, 1982; Strickland et al., 1985).

10. CÉLULAS DE LANGERHANS

Las células de Langerhans epidérmicas (CL) (Langerhans, 1868) son potentes presentadoras de antígenos y, debido a su localización en la capa suprabasal de la epidermis, son susceptibles a los efectos de la radiación ultravioleta.

Tienen su origen en la médula ósea y son transportadas por la sangre hasta la piel, donde se introducen entre los queratinocitos adoptando una forma dendrítica.

Se ha demostrado "in vitro" que incorporan timidina y son, por lo tanto, capaces de multiplicarse; a pesar de ello se cree que la contribución de la división celular en el mantenimiento de su población en la epidermis normal es poco relevante.

Se sabe que participan en las respuestas inmunitarias del organismo. Tienen receptores de superficie y marcadores inmunológicos similares a los de los macrófagos. Éstos se unen al fragmento Fc de la IgG y de la IgA, y al componente C3 del complemento. Al igual que los linfocitos T, presentan en su superficie el antígeno T4.

En las lesiones por dermatitis de contacto se observan linfocitos que se agrupan alrededor de las células de Langerhans. Éstas captan antígenos extraños en su superficie y los presentan a los linfocitos T, de forma que estos puedan responder. Por tanto, las células de Langerhans son importantes agentes en las respuestas alérgicas de contacto y otras reacciones inmunitarias cutáneas mediadas por células.

Un cuestión importante que se planteó fue de qué forma la exposición de la piel a la radiación ultravioleta induce los linfocitos T inmunosupresores, responsables de inhibir las reacciones de rechazo del tumor.

La inducción de las células supresoras (linfocitos T supresores) se debe a que la radiación ultravioleta cambia la forma en la que el antígeno es presentado al sistema inmune central.

Estas conclusiones se alcanzaron a raíz de los trabajos en los que se estudiaba la inhibición de la reacción alérgica por contacto en ratas irradiadas. Se utilizaban como agentes alérgicos haptenos como el dinitrofluorobenzeno (DNFB) (Bergstresser et al., 1980). Usualmente el hapteno (antígeno) es presentado por las células de Langerhans, las cuales estimulan la vía efectora del sistema inmune. Si estas células son inactivadas por la radiación UV, se bloquea la vía efectora. En consecuencia, el antígeno es presentado por medio de una ruta diferente, la cual es resistente a la radiación ultravioleta y activa la vía supresora del sistema inmune (Figura 15) .

De la misma forma, las células supresoras que incapacitan el rechazo del tumor actúan según un mecanismo similar.

En las lesiones de dermatitis por contacto se observaron linfocitos que se agrupaban alrededor de las CL, ésta fue otra demostración experimental de la funcionalidad de las CL en la captación de antígenos en su superficie y posterior presentación a los linfocitos T.

Es obvio, por tanto, que una alteración tanto en el número como en la funcionalidad de la CL puede provocar una pérdida en la capacidad de reacción de la piel frente las lesiones iniciadas por la RUV, generándose así un compromiso en el mantenimiento de la salud cutánea.

El proceso de defensa inmune de la piel (figura 17), en el que se ve implicado este tipo celular, es el siguiente (Pauly y Pauly, 1996):

1. Penetración del exoantígeno o creación del antígeno en la epidermis
2. Captura y procesamiento del antígeno por parte de las CL
3. Migración y maduración de las CL desde la epidermis hasta el nódulo linfático
4. Presentación del antígeno por parte de las CL a los linfocitos T
5. Inducción de una respuesta inmune específica: estimulación y proliferación de los linfocitos T específicos para el antígeno
6. Migración de los linfocitos T por vía sanguínea hasta la dermis

7. Inducción de una respuesta inmune específica cuando se produce una nueva exposición al antígeno produciéndose una eliminación del mismo por un proceso inflamatorio

A lo largo de todo este proceso, las CL tienen un papel fundamental y permanente como centinelas: detectan y capturan antígenos, y los transforman mediante un proceso de endocitosis mediada por receptores (Hanau et al., 1988).

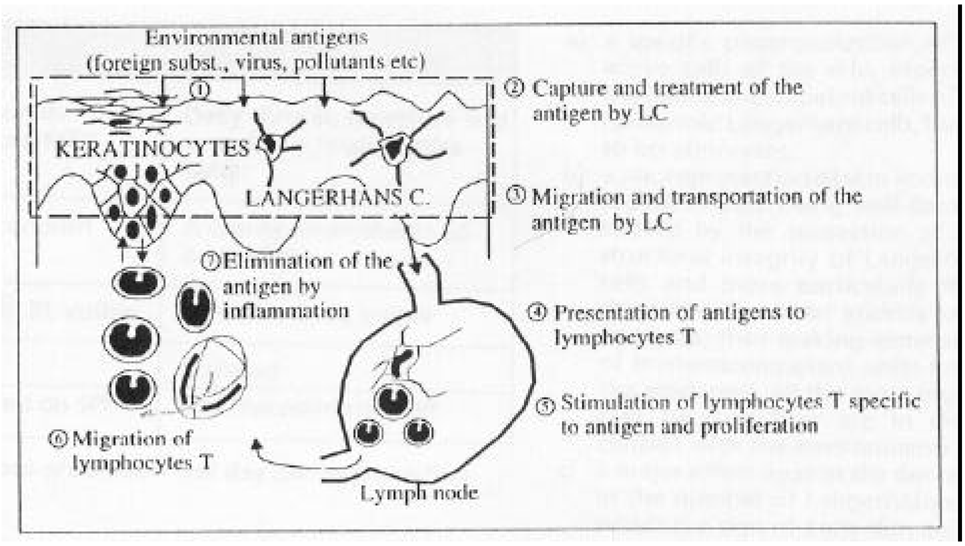


Figura 17. Etapas del proceso de defensa inmune de la piel (Schmitt, 1991).

11. FOTOPROTECCIÓN

Como ya sabemos, la mayoría de los efectos dañinos de la radiación solar resultan de los sucesos que siguen a la absorción de la radiación ultravioleta por parte del DNA, RNA, proteínas, enzimas, orgánulos, lípidos de membrana celular, etc., presentes en las células de la epidermis y de la dermis.

La fotoprotección y la prevención de los efectos deletéreos de la radiación ultravioleta se pueden conseguir mediante procesos de atenuación que comprenden:

A) Absorción de la radiación incidente

B) Dispersión de la radiación

C) Reflexión de la radiación

D) Inhibición de las reacciones implicadas en la generación de radicales libres que suceden en las células viables de la epidermis y de la dermis

Considerando dichas premisas, en la práctica, la fotoprotección se consigue siguiendo dos estrategias diferentes:

1/ Aplicación tópica de filtros solares sobre la piel, los cuales contienen una cantidad conocida de productos químicos (o no químicos) con capacidad de absorción en el espectro UV, y que previenen la penetración de los rayos incidentes de luz UV.

2/ Administración oral de productos fotoprotectores que son no tóxicos y efectivos en el aprovisionamiento de una elevada concentración de moléculas con capacidad de absorción UV en el lugar de reacción, a través del fluido extracelular (plasma) que baña las células de la epidermis y de la dermis.

En relación con todo lo visto hasta el momento, los fundamentos en los que se basa la acción de los filtros solares son los siguientes:

- Absorción de la radiación UV incidente en la piel, que se lleva a cabo mediante la creación de una fina capa sobre la superficie de la epidermis, la cual contiene uno o más compuestos químicos con gran capacidad de absorción selectiva de la radiación ultravioleta, y que no permiten que una proporción significativa de esta irradiación (95%) penetre en la piel.

- La dispersión y reflexión se consiguen gracias a la utilización de formas particuladas de óxido de zinc (ZnO) y/o dióxido de titanio (TiO_2). Estos compuestos tienen unas propiedades físicas que hacen que sean unos buenos elementos refractarios de la radiación UV.

- La inactivación de los radicales libres y/o especies reactivas del oxígeno (ERO) generadas en la piel por la radiación UV, se consigue parcialmente mediante la utilización selectiva de quenchers o scavengers de estas especies radicalares. Estas especies son moléculas antioxidantes necesarias en la piel a una elevada concentración (β-caroteno, vitamina C, α-tocoferol, ciertos tioles o compuestos ricos en grupos SH como el glutatión).

Mientras que las dos primeras medidas son muy efectivas en la protección de la piel frente a la luz ultravioleta, la efectividad de la tercera medida es limitada debido a la pobre capacidad de estas substancias de difundirse en la epidermis. Conseguir una concentración adecuada de estos productos antioxidantes, los cuales han de pasar el estrato córneo para llegar a la epidermis es complejo. Por eso, se tiene una tendencia a hacer una complementación en este aspecto desde un punto de vista sistémico mediante una administración oral de antioxidantes (Pathak, 1996).

Llegados a este punto, vemos que los filtros solares comerciales se pueden dividir arbitrariamente en cuatro categorías:

- *CATEGORÍA A:*

Los productos englobados dentro de esta categoría contienen principalmente compuestos con capacidad de absorción de UVB (Tabla 2). El factor de protección solar (FPS) de dichos productos puede ser de 15 o inferior (rango de FPS de 4 a 15).
Contienen compuestos químicos que bloquean o filtran la radiación UVB como por ejemplo el PABA (ácido para amino benzoico) o ésteres de PABA conocidos como octil-salicilato, cinamatos (octilmetoxi cinamato), homomentil salicilato, etc.

Grupo	Nombre del compuesto	Concentración máxima	Rango de absorbancia
Aminobenzoato	(1) Ácido para-aminobenzoico (PABA)	5%	260-313
	(2) Etil-4-[bis(hidroxipropil)-aminobenzoato]	5%	260-313
	(3) Gliceril PABA	5%	264-315
	(4) Amil p-dimetilbenzoato	1.4-8%	260-325
	(5) 2-etilhexil PABA (Padimato-O)	1.4-8%	264-320
Cinamatos	(6) Cinoxato	1-3%	280-310
	(7) Dietanolamina p-metoxi cinamato	8-10 %	280-310
	(8) 2-etil p-metoxi cinamato	2-7%	280-320
Salicilatos	(9) 2-etilhexil salicilato	3.5-5%	280-320
	(10) Homosalato	10%	290-320
	(11) Trietanolamina salicilato	5-12%	260-320
	(12) Trolamina salicilato	3%	260-355
Benzofenonas	(13) Dioxibenzona	3%	260-355
	(14) Sulisobenzona	5-10%	260-360
	(15) Oxibenzona	2-6%	270-360
	(16) Etil-hexil, 2-ciano-3,3 difenil acrilato	7-10%	290-360
Diversos	(17) Lawsona con dihidroacetona	0.25-5%	320-380
	(18) Ácido 2-fenilbenzimidazol-5-sulfónico	1-4%	290-320
	(19) Digaloil trioleato	2-5%	270-320
	(20) Red vet-petrolatum	>30%	
	(21) Dióxido de titanio	2-2.5%	250-380
	(22) Mentilantralinato	3.5-5%	280-340

Tabla 2. Ejemplo de algunos compuestos con capacidad de absorción UVB utilizados en la formulación de filtros solares (tomado de Pathak, 1996).

- *CATEGORÍAS B y C*

Compuestos que son una combinación de productos, conteniendo productos con capacidad de absorción de la radiación UVB (Tabla 2) y productos capaces de absorber la radiación UVA, habitualmente conocidos como benzofenonas (Tabla 3).

Compuesto químico	Concentración recomendada	Rango de protección (nm)	Efectos adversos
Benzofenonas			
1) Oxibenzona	2-6%	320-360	Parcialmente efectivo y un poco irritante
2) Sulisobenzona	5-10%	320-360	Parcialmente efectivo y un poco irritante
3) Dioxibenzonas	3%	320-260	Parcialmente efectivo y un poco irritante
Otros compuestos químicos			
4) Metilantranilato	3%	300-340	Parcialmente efectivo
5) Butilmetoxi-dibenzoil metano (Parsol 1789)	3% o menos	320-400	Efectivo hasta 400 nm pero irritante
6) Red-Vet-petrolatum	>30%	320-370	Sensibilizante e irritante
7) Dióxido de titanio	2-25%	300-400	Efectivo pero cosméticamente no aceptable
8) Óxido de zinc	2-20%	300-400	Efectivo pero cosméticamente no aceptable

Tabla 3. Ejemplo de algunos compuestos con capacidad de absorción UVA utilizados en la formulación de filtros solares. (tomado de Pathak, 1996)

Los productos tipo B son efectivos protegiendo frente a la radiación UVB, pero sólo son parcialmente efectivos protegiendo frente a la radiación UVA. Sus valores de FPS varían de 15 a 30. Las benzofenonas están disponibles en el mercado y no están sujetas a ninguna restricción por patente. En consecuencia, su uso es amplio y son comercializadas por muchas empresas de producción de filtros solares. Los filtros solares de tipo B están ampliamente comercializados y, de hecho, dominan el negocio de los filtros solares hoy en día.

Los filtros solares de tipo C son más efectivos que los de tipo B respecto a la protección frente a UVA. Esta capacidad se debe a que habitualmente estos compuestos contiene un producto denominado Parsol 1789.

- *CATEGORÍA D*

Además de contener compuestos químicos contra la irradiación UV, estos filtros contienen filtros físicos (dióxido de titanio, óxido de zinc, sales de hierro como el óxido férrico). Son filtros efectivos tanto frente a la radiación UVA como a la UVB.

12. LA PARADOJA DE LOS FILTROS

Los filtros solares nos protegen frente a los efectos nocivos de los rayos solares. Pero ¿qué se entiende por protección? ¿Es total esta protección?

Como hemos visto anteriormente, uno de los efectos de la radiación ultravioleta es una disminución en la eficacia del sistema inmune. Ello implica un cierto riesgo respecto a la eficacia del funcionamiento de nuestro sistema inmune, con todos los peligros asociados que ello implica.

Esta disminución, ¿es previa a la aparición del eritema producido por esta irradiación?

En este punto reside la importancia de los efectos nocivos de la radiación ultravioleta.

Actualmente los filtros solares presentan un factor de protección solar (FPS) que es el reflejo de la capacidad de prevenir la generación del eritema. En este sentido, la denominada DEM (Dosis Eritemógena Mínima) indica la energía mínima necesaria para desencadenar eritema y, a efectos prácticos, habitualmente se expresa como el

tiempo mínimo necesario para que la RUV produzca eritema. Es decir, un filtro con un FPS de 20 nos indica que con la aplicación del filtro se multiplica por 20 el tiempo que podemos exponernos a la RUV sin que aparezca eritema (20xDEM).

Así pues, hoy en día los filtros solares sólo toman como referencia para su evaluación la DEM, sin tener en cuenta, por ejemplo, la desaparición de las células de Langerhans, que acarrea una disminución en la eficacia del sistema inmune.

La paradoja obviamente es la siguiente: la población se ha ido acostumbrando a exponerse a la radiación solar tranquilamente, ya que cada vez los filtros solares tienen factores de protección más elevados; pero esta exposición intensiva tiene una contrapartida menos aparente que una quemadura. Los efectos nocivos sobre el sistema inmune hacen que seamos más susceptibles a sufrir toda una serie de efectos indeseables y a más largo plazo.

Por ello, se hace necesaria una reconsideración respecto la evaluación de la capacidad protectora de los filtros solares, en la que no sólo se tenga en cuenta la protección frente al eritema sino que también tendríamos que considerar las capacidades preventivas y protectoras del filtro frente a la inmunosupresión, generación de radicales libres, daño en el DNA, etc. Ya que, si la dosis necesaria para producir estas alteraciones es inferior a la necesaria para producir el eritema, entonces el FPS se debería revisar a la baja. En consecuencia, el FPS se debería basar, respecto a su evaluación, por lo menos en aquella afectación o lesión biológica que aparezca antes.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

La radiación ultravioleta produce cambios en el organismo humano. Estos daños se ponen en evidencia en la epidermis mediante el eritema. Pero hay también consecuencias no tan evidentes a nivel local sobre la inmunidad celular (células de Langerhans) y probablemente a nivel sistémico que aparecen posteriormente, como por ejemplo el cáncer cutáneo.

Todos estos procesos han sido relacionados, estos últimos años, con reacciones donde están implicados los RLO que por su poder oxidante dañan el DNA, las membranas celulares y las proteínas.

Para determinar el factor de protección (FPS) de los filtros solares, actualmente se valora su capacidad para prevenir el eritema, una vez establecida la dosis eritemógena mínima (DEM). En ningún caso se tienen en cuenta otras afectaciones locales y sistémicas que puedan darse con intensidades energéticas equivalentes a 1 DEM o inferiores.

Nuestra hipótesis de trabajo es la siguiente:

Tras una irradiación UV, se produce una pérdida de la inmunidad celular y un aumento del estrés oxidativo en la piel, y dichas alteraciones tienen consecuencias a nivel sistémico. Puesto que estos efectos pueden aparecer a dosis energéticas inferiores a las equivalentes a 1 DEM, la determinación del FPS debe revisarse teniendo en cuenta estas circunstancias.

Para confirmar esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

2. OBJETIVOS

I. Desarrollar un modelo de estudio de las células de Langerhans (número, funcionalidad, forma, dendritas, etc) para conocer su grado de afectación después de la irradiación UV.

II. Determinar parámetros de interés, relacionados con el estrés oxidativo, tanto locales (epidermis) como sistémicos (sangre), y sus alteraciones tras la radiación UV.

III. Establecer las posibles interrelaciones locales y sistémicas entre los cambios observados en las células de Langerhans y en los parámetros relacionados con el estrés oxidativo, derivados de la radiación UV.

IV. Validar la utilidad del modelo de rata *hairless* para alcanzar los objetivos propuestos.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES UTILIZADOS

Se utilizaron ratas *hairless* macho Ico:OFA hr/hr (CRIFFA) de entre 8 y 10 semanas.
Los animales se mantuvieron en el estabulario previamente al inicio del proceso experimental, durante un período de 15 días, a fin de aclimatarlos a las condiciones de estabulación estándar.
Las condiciones de vida, las mismas para todos los animales, se detallan a continuación: las ratas se mantuvieron en el estabulario en jaulas estándar de MAKROLON® (23x46x14cm) a una temperatura ambiental regulada con un termostato eléctrico de 20-22º C y una humedad relativa del 60-70%. Los animales fueron sometidos a ciclos de 12 horas de luz artificial con neón de luz blanca y 12 horas de oscuridad.
Respecto a la alimentación, se utilizó pienso de mantenimiento de tipo A.04 PANLAB® y agua clorada. Tanto el pienso como el agua se suministraron *ad libitum*.
Los animales fueron sacrificados mediante exsanguinación completa bajo anestesia (ver más adelante).
Se obtuvo la autorización del Comité Ético de Experimentación Animal de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad Rovira y Virgili para la realización del procedimiento experimental así como para el sacrificio de los animales. El cuidado y manipulación de los animales se realizó siguiendo la ley aprobada en el año 1995 por el Parlamento de Cataluña 5/1995, del 21 de junio, de protección de los animales utilizados para experimentación y para otras finalidades científicas.



Figura 18. Rata *hairless* como modelo experimental utilizado en los estudios con radiación ultravioleta.

2. PATRÓN DE IRRADIACIÓN

Los animales se sometieron, bajo condiciones controladas, a diferentes intensidades de radiación UV.

El proceso de irradiación se llevó a cabo mediante la utilización de un solarium artificial consistente en 6 lámparas PHILIPS TL 20W/12 RS UVB Medical, sobre una estructura diseñada para poder ubicar y tratar con comodidad y eficacia los animales de experimentación (Figura 21A).

La comprobación del rango energético de la lámpara utilizada en el proceso experimental se realizó mediante un radiómetro (Solatell Sola-Scope I); esta comprobación es necesaria para conocer que realmente cada lámpara tiene el máximo energético en la longitud de onda que nos interesa (en nuestro caso rango UVB) (Figura 19).

El mantenimiento de este patrón energético se comprobó antes de cada irradiación para poder detectar variaciones o alteraciones en las lámparas y ajustar la dosis si la

magnitud de esta variación no es muy grande, o bien, en caso contrario, sustituir la lámpara por una nueva.

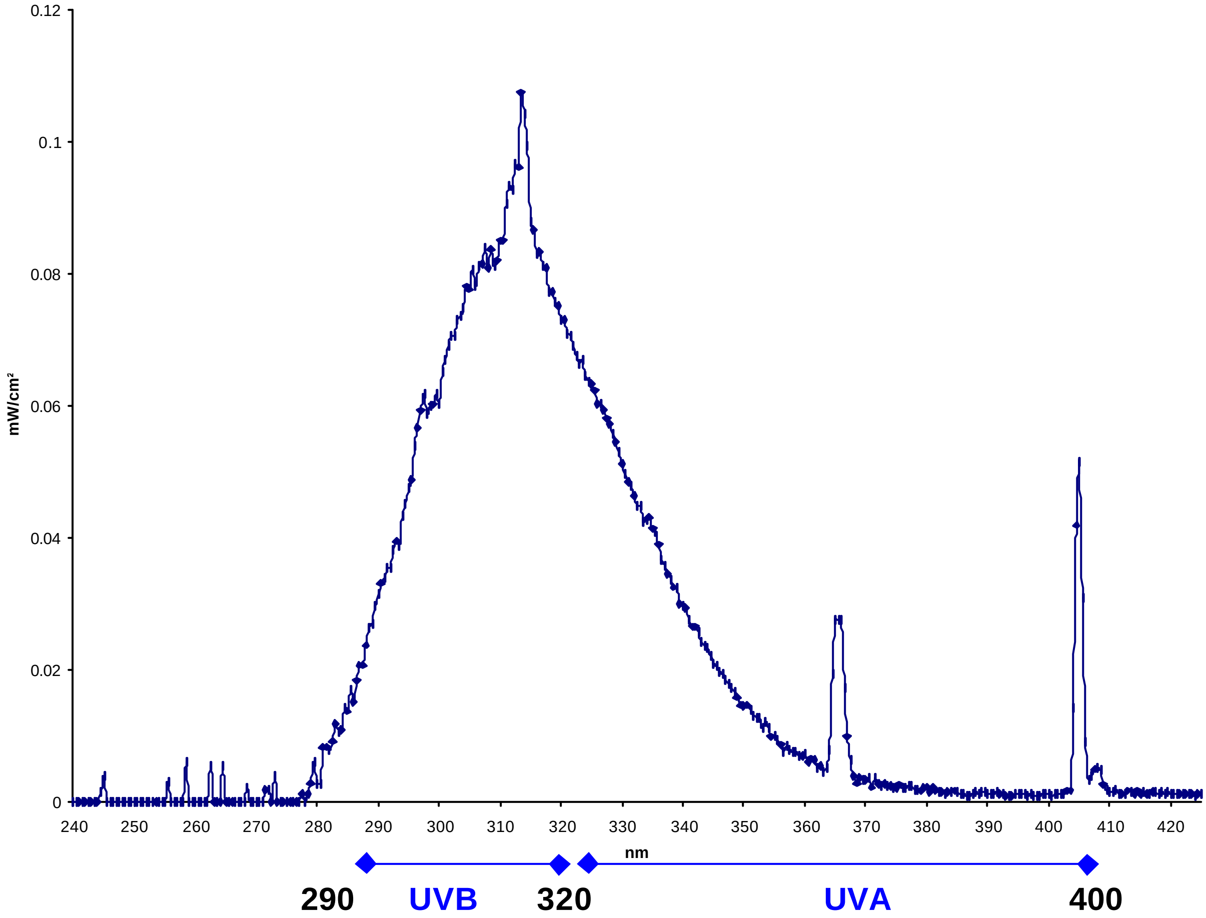


Figura 19. Rango energético de la batería de lámparas utilizadas en nuestro experimento.

El tratamiento se realizó colocando a los animales en una jaula, especialmente diseñada para esta finalidad, en la cual se dispusieron a la vez 4-6 ratas, separadas unas de otras de forma individual. La parte superior de dicha jaula se cubrió con una fina red de plástico, lo que no representó ningún impedimento o interferencia respecto la irradiación de los animales.

En cada experimento se utilizó un lote control, que fue sometido a las mismas condiciones experimentales que los animales irradiados, excepto en la exposición directa a la RUV. En estos animales se colocó una cubierta entre las lámparas y los animales, de forma que recibieron el calor que desprenden dichas lámparas, pero no la irradiación. Definiremos estos grupos control como pseudoirradiados.

Los animales se sometieron a diferentes intensidades de irradiación, en función de los objetivos experimentales:

- Irradiaciones agudas de intensidad 1, 1,25 y 1,56 DEM (irradiación puntual de un día). Este patrón es el habitualmente utilizado en la determinación experimental del FPS de los filtros solares. Se utilizaron 7 ratas en cada uno de los lotes irradiados y 7 ratas en el lote control no irradiado. Los animales incluidos dentro de estos experimentos fueron sacrificados después de 72 horas de la RUV.

El tiempo de irradiación se obtuvo, en todos los casos, conociendo previamente la equivalencia del valor de la DEM para nuestro modelo experimental (es decir, la dosis de energía mínima que provoca la aparición de un eritema con una intensidad dada), mediante la utilización del radiómetro, lo que nos permitió la medida exacta de este parámetro. Este valor resultó ser 1,546 J/cm^2.

	1DEM	**1,25 DEM**	**1,56 DEM**
Tiempo	409s	511s	638s
UV total (J/cm^2)	1,546	1,932	2,412
UVB (J/cm^2)	0,777	0,971	1,212
UVA (J/cm^2)	0,769	0,961	1,200

Tabla 4. Tiempo de irradiación en función de la energía obtenida. (s = segundos)

- Irradiaciones crónicas: este patrón de irradiación intenta reflejar los efectos a más largo plazo de las irradiaciones. Se irradiaron tres lotes de seis animales cada uno de la siguiente forma: un lote se irradió durante 2 meses de tratamiento, recibió 13 dosis de RUV a razón de 1,10 J/cm^2 que corresponde a 0,71 DEM. Otro lote se irradió durante 3 meses, recibió 13 dosis de RUV, a razón de 0,77 J/cm^2 que corresponde a 0,5 DEM. Y un último lote que se irradió durante 5 meses, recibió 25 dosis de 0,94 J/cm^2, lo que corresponde a 0,61 DEM. Cada lote irradiado tenía el correspondiente control pseudoirradiado.

La utilización de intensidades semanales más bajas en el caso de las exposiciones crónicas se debe al hecho que para tiempos prolongados de tratamiento no se puede mantener un nivel energético demasiado elevado a la hora de irradiar, ya que ello implicaría la aparición de lesiones cutáneas, como por ejemplo el cáncer cutáneo, las cuales invalidarían el protocolo experimental.

- Irradiaciones para validar el efecto protector de un filtro solar. Se irradiaron dos lotes de 7 animales cada uno. El primer lote, sin fotoprotector, recibió 1,54 J/cm² que corresponde a 1 DEM durante 2 días consecutivos. Mientras que el segundo lote, tratado con filtro solar, recibió 23,1 J/cm² que corresponde a 15 DEM, durante dos días consecutivos, ya que el filtro solar tenía un factor de protección igual a 15. Ambos lotes disponían de sus correspondientes lotes control, como se detalla más adelante.

3. PROTOCOLO DE SENSIBILIZACIÓN

Dicho protocolo se realizó siguiendo el método descrito por Roberts y Beasley (1995).
Se determinó la funcionalidad de las CL de la epidermis en animales irradiados y pseudoirradiados de forma crónica durante dos meses. Para ello, se sensibilizaron dichos animales con 100µl de dinitrofluorobenzeno al 0,3% (DNFB) en acetona:aceite de oliva (4:1) colocado en un receptáculo de plástico tipo "Hill Top Chamber" sobre la piel del dorso durante tres horas, dos días consecutivos. Al cabo de 5 días se aplicaron dos dosis de recuerdo, en días consecutivos, de 25µl de DNFB al 0,3% en la oreja derecha de todas las ratas y 25µl de excipiente en la oreja izquierda. Al cabo de 24 y 48 horas se midió el grosor de las orejas con un micrómetro Mitutoyo (Tokio, Japón). En cada oreja, también se valoró de forma semicuantitativa el eritema, puntuando de 0 (nada) a 5 (muy enrojecida), y el área afectada mediante una valoración de 0 (nada), 1 (oreja), 2 (oreja+base) a 3 (oreja+base+nuca).

4. APLICACIÓN DE FILTRO SOLAR

En este apartado se utilizaron cuatro lotes, de 7 animales cada uno. El primer lote no fue sometido a irradiación ni a la aplicación de filtro solar (lote CONTROL). El segundo lote de animales recibió una dosis de 1 DEM y consecutivamente se pseudoirradió (como si fuesen controles) hasta un tiempo total equivalente a 15 DEM.

El tercer lote de animales se trató, en la zona dorsal, con el filtro solar a razón de $2mg/cm^2$ de piel, y se sometió a una irradiación de 15 DEM (coincidente con el FPS del filtro).

Finalmente, el cuarto lote de animales se trató con el filtro, pero no se irradió (pseudoirradiación). Este lote nos sirvió para determinar el efecto del filtro por sí solo.

La composición cualitativa del filtro solar aplicado, fue la siguiente:

Tioveil MOTG 50
Aceite de germen de trigo
Aceite de girasol
Urea
Alfa-Bisabolol racémico
Nucleótidos reparadores del ADN (Repair complex)
Citrato trisódico
Soylife Extra
Complejo proteico (MPC)
Entre los ingredientes conservantes destaca la presencia de butil-OH-tolueno

Este filtro fue preparado por Novartis CH y poseía un FPS nominal de 15, valorado según el método COLIPA. Se trata de un filtro de protección UVB+UVA con productos antioxidantes.

En la tabla 5 se resumen los diferentes tratamientos aplicados a los diversos lotes.

PATRÓN DE IRRADIACIÓN	LOTES	DESCRIPCIÓN LOTES/INTENSIDADES	OBJETIVO EXPERIMENTAL
AGUDA	4	CONTROL IRRADIACIÓN 1 DEM IRRADIACIÓN 1,25 DEM IRRADIACIÓN 1,56 DEM	Patrón de irradiación habitualmente utilizado en la determinación del FPS de los filtros solares. Utilizándose aquí para determinar experimentalmente las alteraciones adicionales al eritema, que se producen por estas intensidades de irradiación
CRÓNICA	6	CONTROL CRÓNICO 2 MESES IRRADIACIÓN CRÓNICA 2 MESES (0,71 DEM) CONTROL CRÓNICO 3 MESES IRRADIACIÓN CRÓNICA 3 MESES (0,5 DEM) CONTROL CRÓNICO 5 MESES IRRADIACIÓN CRÓNICA 5 MESES (0,61 DEM)	Patrón de irradiación que intenta reflejar los efectos a más largo plazo de las irradiaciones. Simulándose así una situación de exposición más continuada o sostenida en el tiempo a la radiación ultravioleta, que es lo que realmente sucede en las exposiciones de forma "natural"
IRRADIACIÓN + FILTRO	4	CONTROL IRRADIACIÓN 1 DEM+14 DEM PSEUDOIRRAD. IRRADIACIÓN 15 DEM + FILTRO PSEUDOIRRADIACIÓN 15 DEM + FILTRO	Irradiaciones utilizadas para determinar la capacidad de protección real del filtro solar frente a las afectaciones adicionales al eritema que produce la RUV.

Tabla 5. Resumen de los diferentes tratamientos realizados en función del objetivo experimental.

5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

5.1 Esquema del protocolo experimental

A continuación se muestra de una forma visual el resumen del tratamiento experimental realizado, desde el inicio del tratamiento hasta la obtención de resultados.

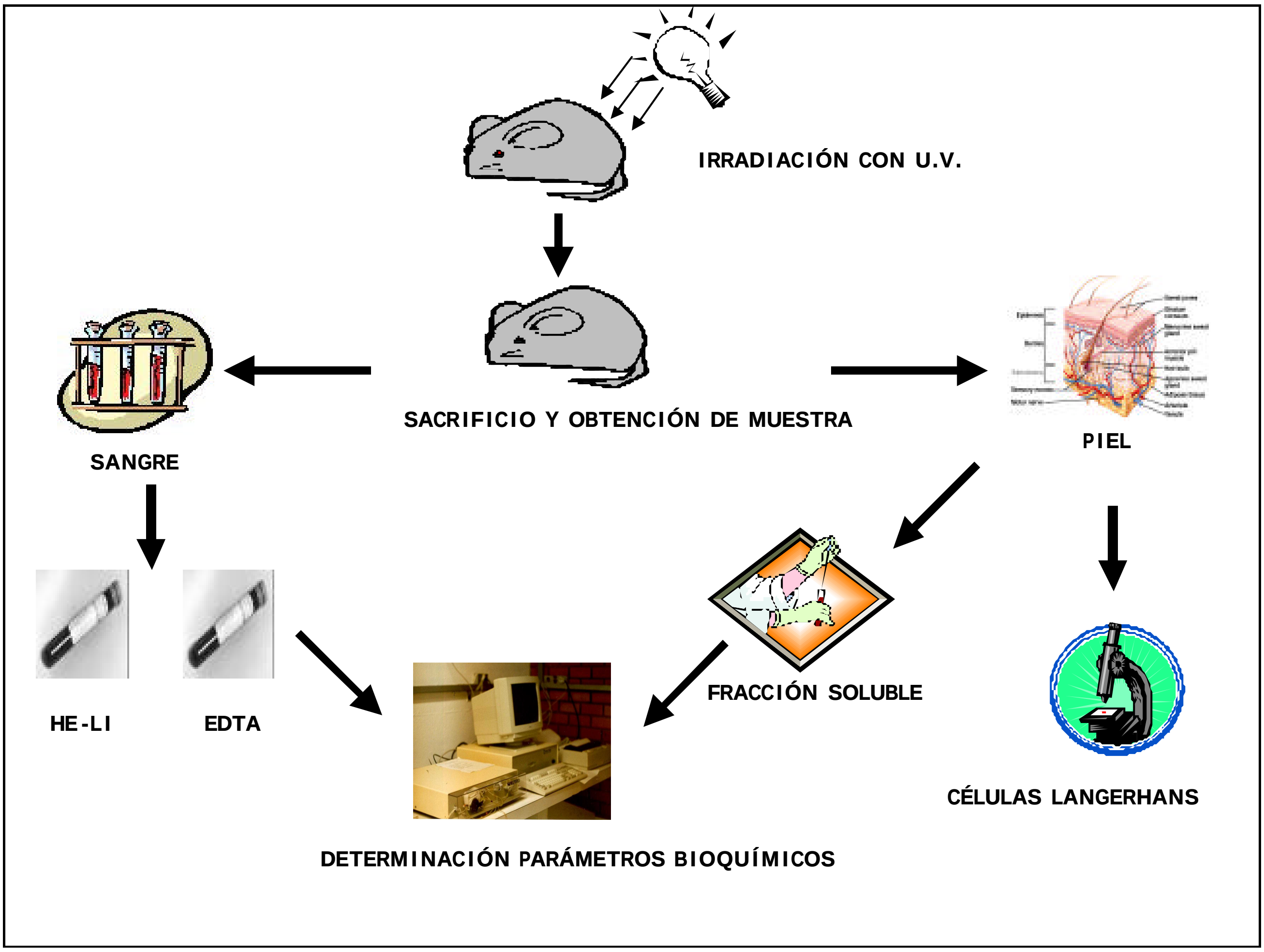


Figura 20. Esquema general del protocolo experimental.

5.2 Detalle del protocolo experimental

De la figura 21B a la 21H se muestran una serie de fotografías que ilustran algunos de los pasos importantes del protocolo experimental, para obtener las muestras que

posteriormente fueron procesadas y, finalmente, los datos experimentales de los parámetros estudiados.



Figura 21. Secuencia que muestra algunos de los pasos importantes del procedimiento experimental. A) solarium UV, B) anestesia del animal, C) depilación de los escasos pelos presentes, D) incisión quirúrgica para acceder a la cavidad abdominal, E) canulación de la arteria aorta, F) inicio del proceso de exsanguinación, G) recogida de sangre en tubos de EDTA y heparina-litio, H) extracción de piel del dorso.

6. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE SANGRE

El mismo proceso de sacrificio implica la obtención de las muestras de sangre. Este consiste en la exsanguinación exhaustiva del animal por medio de punción en la arteria aorta abdominal.

El acceso a esta vía se llevó a cabo quirúrgicamente, con el animal previamente anestesiado con hidrato de cloral (300mg/Kg i.p. disuelto en suero fisiológico).

Una primera muestra de sangre (5ml) se recogió en un tubo de heparina-litio (He-Li); la segunda muestra, también de 5ml, se recogió en un tubo de EDTA. El tipo de anticoagulante condiciona el procesamiento y las posteriores analíticas a realizar en cada muestra de sangre, ya que el anticoagulante puede interferir en la práctica de algunas determinaciones enzimáticas.

La muestra se mantuvo en frío, y el procesamiento y realización de diferentes analíticas sobre esta sangre se inició de forma inmediata a su obtención.

6.1 Obtención de plasma y eritrocitos

En el procesamiento inicial de la muestra, se separaron el plasma y los eritrocitos de cada uno de los tubos (He-Li y EDTA), mediante una centrifugación (5200 x *g*, durante 15 minutos a 4º C), ya que las posteriores analíticas se realizaron en una u otra fracción de la sangre total recogida. Una vez realizada esta separación, se retiró el plasma con una pipeta pasteur para su inmediato procesamiento y realización de las determinaciones analíticas pertinentes. La fracción de los eritrocitos se lavó dos veces con suero fisiológico (2,5ml de suero y posterior centrifugación a 6500 x *g*, durante 5 minutos). Finalizados estos lavados, se procesó esta fracción de eritrocitos, preparándola así para su posterior análisis.

Del tubo de He-Li, se realizaron las siguientes determinaciones analíticas: actividad de la glutatión S-transferasa (GST) en eritrocitos y concentraciones de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) en plasma y eritrocitos. Del tubo de EDTA, se llevaron a cabo las siguientes determinaciones: actividad superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR), glutatión peroxidasa (GPx) en

eritrocitos y concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en eritrocitos y plasma.

7. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE PIEL

Posteriormente a la obtención de las muestras de sangre y consiguiente sacrificio de los animales, se obtuvieron las muestras de piel del dorso de los animales mediante disección quirúrgica. La piel se dispuso en una placa de petri con PBS (tampón fosfato salino), se retiró el tejido adiposo subcutáneo y se cortó en trozos en función de su destino experimental:

a) Trozos pequeños en forma de rectángulo, de unas dimensiones aproximadas de 0,3cm x 0,4cm, de los cuales, una vez procesados, se obtuvo el material necesario para realizar las diferentes técnicas microscópicas de observación y recuento de células de Langerhans.

b) Porciones de piel de mayores dimensiones (0,7cm x 0,9cm) para determinar los parámetros bioquímicos relacionados con el estrés oxidativo en epidermis.

c) Una zona central de 0,5cm de ancho por 8cm de largo para poder incluir en parafina y determinar, en los animales irradiados crónicos, los derivados hidroxilados de los ácidos nucleicos (8-OH-desoxiguanosina, 8-OH-guanosina).

7.1 Extracción de la epidermis y técnica histoquímica para determinar el número de células de Langerhans

El procedimiento para la extracción de la epidermis se basa en el protocolo descrito por Scaletta y MacCallum (1972).
Una parte de la piel troceada se dispuso en un vial con unos 5ml de tampón Na_4EDTA-PBS, 20mM, se tapó con Parafilm® y se dejó incubar durante una hora en un baño de 37º C. Pasado este tiempo y comprobado que la epidermis se podía separar bien, se cambió el tampón por suero fisiológico en el mismo vial.

Los rectángulos de piel del vial con suero se fueron introduciendo en una placa de petri de 3,5cm de diámetro, con tampón de lavado frío (tampón trismal 0,2M; Merck, ref. 8387, con un 6,48% de sacarosa). En dicha placa, se separó la epidermis mediante dos pinzas, una con dientes para sujetar la dermis y otra, más fina, para poder estirar la epidermis más fácilmente. Ésta se dispuso en el tampón estirada al máximo y con la cara dérmica en contacto con el líquido.

Este proceso se hizo bajo una lupa binocular, y se obtuvieron entre 6 y 8 cortes de piel de cada animal, que se depositaron en una misma placa, conservada en frío sobre una bandeja con hielo.

Una vez separadas todas las muestras de epidermis, se aplicó el método descrito por Mackenzie y Squier (1975), para la tinción y posterior visualización de las CL al microscopio óptico. Para ello, las muestras de epidermis se lavaron tres veces, durante 7 minutos cada vez, con el mismo tampón de lavado y sobre hielo. Una vez finalizados los lavados, se extrajo el tampón y se añadió formaldehído tamponado frío al 4% (Panreac 172931), manteniéndose así durante 20 minutos, también sobre hielo. Finalizado este tiempo, se extrajo el formaldehído y se lavaron las muestras tres veces, durante 10 minutos cada vez, con tampón de lavado y sobre hielo.

Posteriormente, se sacó el tampón de lavado y se puso en tampón de incubación (2,5mg de ADP, 2,5ml SO_4Mg al 5%, 1,5ml $(NO_3)_2Pb$ al 2%, con 21ml de trismal pH 7,3 que contenía un 8,55% de sacarosa) (Chaker et al., 1984) durante 50 minutos a 37º C en un incubador. Finalizada la incubación, se sacó el tampón de incubación y se introdujeron las muestras de epidermis en un tubo lleno de pequeñas bolitas de vidrio; se llenó este tubo con tampón de lavado y se hicieron 4 lavados de 10 minutos cada uno, en agitación continua. Una vez finalizados los lavados, se sacó el tampón de lavado y se añadió sulfuro de amonio (Fluka, ref. 09981) diluido 1:10 con agua destilada, incubándose durante 5 minutos.

Posteriormente, se retiró el sulfuro de amonio y se hicieron 4 lavados de 10 minutos cada uno con el tampón de lavado y bajo agitación continua.

Una vez finalizados los lavados, las muestras de epidermis ya teñidas se dispusieron sobre un portaobjetos con glicerol y se cubrieron con un cubreobjetos de 22mm x 22mm, que se fijó, una vez seco, con laca de uñas.

Se contaron 10 campos de cada muestra de epidermis con la ayuda de una rejilla ocular cuadriculada, con un área de cuadrícula de 0,0144 mm^2.

7.2 Procesamiento de la piel para determinar los parámetros bioquímicos en epidermis.

Las restantes porciones de piel (40-50 porciones de cada animal) se introdujeron en otro vial con tampón Na_4EDTA-PBS 20mM, y se mantuvieron en un baño a 37º C durante dos horas (Scaletta y MacCallum, 1972). Pasado ese tiempo, se extrajo el tampón y se puso suero fisiológico. Seguidamente, se procedió a la separación de la epidermis. Una vez conseguidos unos 200mg de epidermis bien escurrida mediante una fina malla de nylon, se homogeneizó la muestra en un homogeneizador de vidrio y émbolo de teflón, con tampón fosfato sódico 0,2M, pH 6,25 (1:25 p/v).

El homogeneizado se centrifugó durante una hora a 105000 x *g* a 4º C. Una vez finalizada la centrifugación, se recuperó la fracción soluble, se alicuotó en las cantidades adecuadas para las posteriores determinaciones y se congeló a -20º C.

La determinación de la actividad GST debe realizarse justo después de la ultracentrifugación, ya que esta enzima pierde su actividad si se somete a un proceso de congelación.

7.3 Procesamiento de la piel para determinar los derivados hidroxilados de DNA.

Para observar el daño oxidativo de los RLO en el DNA de las células de la piel, se llevó a cabo una técnica inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo primario de conejo anti-8-OH-desoxiguanosina, que también reacciona con la 8-OH-guanosina, ambos derivados hidroxilados de DNA (Kikuchi et al., 2002)

Se partió de cortes de piel parafinada de un grosor de 6 a 8 µm. La muestra, una vez fijada al porta, se desparafinó e hidrató sumergiendo los portaobjetos a los siguientes productos: xilol, etanol absoluto, etanol de 70º, etanol de 50º, etanol de 30º y agua destilada, durante 7 minutos cada uno y a temperatura ambiente.

A continuación, las muestras se sumergieron durante 30 minutos en una solución de metanol/H_2O_2 al 10%, para bloquear la actividad peroxidasa endógena.

Posteriormente, se realizó un lavado, sumergiendo los portaobjetos en soluciones de TBS (Tris HCl 20 mM NaCl 150 mM pH 7,4) durante 5 minutos.

El siguiente paso consistió en la incubación con suero normal de conejo, durante 30 minutos, con la finalidad de disminuir la proporción de uniones inespecíficas.

Seguidamente, se incubó el tejido con el anticuerpo primario anti-8-OH-desoxiguanosina (AHP592 de Serotec) a una dilución al 1/500 con PBS, durante toda la noche.

El anticuerpo secundario (anti-conejo) asociado a peroxidasa (sc-2768 de Santa Cruz Biotechnology) diluido 1/100, se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Para aumentar el marcaje posterior con DAB, y tras un lavado con TBS de 5 minutos, se incubó la muestra durante una hora con PAP procedente de cabra (Peroxidase-Anti-Peroxidase Soluble complex, P-1901 de Sigma) a una dilución 1/100. Se realizó otro lavado con TBS y, a continuación, el revelado de la peroxidasa con 3,3'-diaminobenzidina (DAB, D-4418 de Sigma) durante 5 minutos. La reacción se detuvo con agua.

Posteriormente, se deshitrataron las muestras sumergiendo los portaobjetos sucesivamente en: agua destilada, etanol 30º, etanol 50º, etanol 70º, etanol absoluto, xilol 100% (unos 7 minutos en cada uno de ellos, a temperatura ambiente).

Finalmente, se montaron los cubreobjetos sobre las muestras con DPX (*Distrene, Dibutyl phthalate and xylene)* y se procedió a la observación al microscopio óptico y al fotografiado de los cortes histológicos.

8. METODOLOGIAS UTILIZADAS

8.1 Estudio de los sistemas defensivos enzimáticos en eritrocitos y epidermis:

8.1.1 GST

Los eritrocitos lavados se diluyeron 1:20 con tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6,25 con EDTA 1mM para su hemólisis. Se prepararon 10ml de Sephadex CM 50 (Pharmacia Biotech ref.17-0220-01) con el tampón anterior a la proporción 1:100, y se centrifugaron durante 10 minutos a 6500 x *g* para la compactación de la columna. Cinco ml del hemolizado se mezclaron con 5ml del Sephadex compactado, se agitó

manualmente durante 3 minutos para fijar la hemoglobina y se centrifugó de nuevo utilizando las mismas condiciones (10 minutos a 6500 x *g*). Del sobrenadante obtenido (5ml), se separaron 3ml en un tubo de vidrio, que se calentó durante 25 minutos a 52º C. Esta fracción se utilizó para calcular la actividad GST termoestable. Los 2ml restantes del sobrenadante se conservaron en un tubo de plástico a 4º C; a partir de este tubo se calculó la actividad GST total.

Para analizar la actividad de la GST (total y termoestable) se siguió el método descrito por Habig et al. (1974), utilizando 1-cloro-2-4-dinitrobenzeno 30mM (CDNB) (Sigma G-4251) como substrato.

La actividad GST se valoró con un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 2, determinando la formación del conjugado GSH-CDNB a 340nm durante 5 minutos (reacción lineal).

La actividad de la GST se expresó en unidades (una unidad U=1 μmol de CDNB conjugado/minuto).

8.1.2 SOD

La SOD se analizó por el método de la autooxidación de la epinefrina, que se basa en la producción de aniones superóxido mediante la oxidación espontánea de la epinefrina a pH alcalino (Misra y Fridovich,1972).

Los superóxidos formados oxidan la epinefrina (Sigma E-4355) a adrenocromo. La SOD transforma los superóxidos en H_2O_2 y O_2, evitando de esta manera la formación de adrenocromo. La cantidad de adrenocromo formado se registró de modo continuo con el espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 2, a una longitud de onda de 480nm.

En primer lugar se determinó la curva de autooxidación de la epinefrina, mezclando 2,5ml de tampón Na_2CO_3 (Merck, ref. 6392) - $NaHCO_3$ (Probus, ref 2030) 50mM, pH 10,2, EDTA 0,1mM (Merck, ref 8418.0100) con 300μl de agua bidestilada y 200μl de epinefrina 6mM en HCl 1mM, haciendo las lecturas a 30º C, cada minuto, durante 10 minutos.

Después se hicieron diluciones sucesivas del citosol para determinar la concentración que inhibía en un 50% la formación de adrenocromo (CI_{50}).

Los resultados se expresaron como Unidades/gramo de hemoglobina o Unidades/mg de proteína (una unidad, U=cantidad o contenido de muestra que inhibe en un 50% la transformación de epinefrina en adrenocromo).

8.1.3 CAT

Si se parte de la muestra de eritrocitos lavados, éstos se lisaron con 10 volúmenes de agua destilada fría. En el caso de las muestras de epidermis se utilizó directamente la fracción soluble para determinar la actividad de esta enzima en la piel.

Dicha actividad se determinó también con el espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 2, a una longitud de onda de 240nm, calculándose la velocidad de desaparición del peróxido de hidrógeno (15mM) siguiendo el método de Cohen et al. (1970).

Los resultados se expresaron como Unidades/gramo de hemoglobina o Unidades/mg de proteína (una Unidad=1 μmol de peróxido de hidrógeno transformado/minuto).

8.1.4 GPx

A partir de una dilución del hemolizado (1:20) de la muestra de eritrocitos del tubo con EDTA, se introdujeron 120μl de hemolizado en una cubeta con 2,75ml de tampón fosfato potásico 100mM, pH 7,5, EDTA 0,5mM.

A esta mezcla se añadieron: 30μl de NADPH 20 mM, 100μl de GSH 60 mM y 4μl de GSSG reductasa (1U de enzima en la cubeta).

Tras una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 100μl de hidroperóxido de cumeno 36mM.

La disminución de la absorbancia, como resultado de la desaparición del NADPH debida a la actividad de la GPx, se registró en el espectrofotómetro Perkin Elmer lambda 2, a una longitud de onda de 340nm (Wheeler et al., 1990).

Los resultados se expresaron en Unidades/gramo de hemoglobina, en el caso de los eritrocitos y como Unidades/gramo de tejido o miligramo de proteína en el caso de la epidermis (una Unidad, U=1 μmol de NADPH transformado/minuto).

8.1.5 GR

Para un volumen final de 3ml en la cubeta, se partió de 120μl del mismo hemolizado utilizado para la determinación de la GPx y se mezclaron con 2,75ml de tampón fosfato sódico 100 M, EDTA 5mM y 100μl de GSSG 75mM.

Después de una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 30μl de NADPH y se registraron las lecturas en el espectrofotómetro Perkin Elmer lambda 2 (340nm) (Wheeler et al., 1990).

Se calculó la actividad de la enzima de forma indirecta, a través de la producción de NADP a partir del NADPH consumido durante el proceso de reducción del GSSG.

Los resultados se expresaron en Unidades/g de hemoglobina, en el caso de los eritrocitos, y en Unidades/gramo de tejido o miligramo de proteína, en el caso de la epidermis (una Unidad, U=1 μmol de NADPH transformado/min).

8.2 Análisis del glutatión reducido (GSH) y del glutatión oxidado (GSSG) en eritrocitos y epidermis

El GSH reacciona específicamente con el O-ftalaldehído (OPT) (Merck 11452) a pH 8. Si el pH se incrementa por encima de 8, se produce espontáneamente el paso de GSH a GSSG.

El GSSG reacciona con el OPT a pH 12 y no se afecta por pequeñas variaciones del pH. La N-etil-maleimida (NEM) (Merck 1308) impide la oxidación de GSH a GSSG.

La determinación se realizó midiendo en paralelo, a partir de la misma muestra inicial, el contenido de GSH y GSSG.

La porción de muestra utilizada para valorar el GSH se disolvió en tampón fosfato sódico 100mM, EDTA 5mM (pH=8) y se puso en contacto con el OPT, se mezcló y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente; pasado este tiempo se hicieron las lecturas en un fluorímetro Perkin Elmer LS 50B.

En cambio, a la fracción de la muestra utilizada para valorar el GSSG, se añadió NEM y se dejó incubando 20 minutos, para evitar el paso de GSH a GSSG, y así descartar que la cantidad de GSSG sea mayor como consecuencia de la propia oxidación del GSH. Una vez pasados los 20 minutos, se diluyó la preparación en tampón (pH=12) y se añadió el OPT. Se mezcló y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurridos los 15 minutos se procedió a la lectura en el fluorímetro.

Las condiciones del fluorímetro tanto para GSH como para GSSG fueron: longitud de onda de excitación 350nm, longitud de onda de emisión 420nm; rendija excitación/emisión 5nm (Hissin y Hilf, 1976).

8.3 Determinación de proteínas

Las proteínas fueron evaluadas según el método de Lowry et al.(1951). Se utilizó como estándar la seroalbúmina bovina (BSA) (Merck 12018). La medición se realizó en el espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 2 a 750nm.

Los resultados se expresaron en miligramos de proteínas/g de tejido.

8.4 Determinación de los TBARS

Los TBARS se valoraron utilizando el método de Buege y Aust (1978). Este método se basa en la reactividad del ácido tiobarbitúrico (TBA) con el malondialdehido (MDA), lo que genera un producto MDA:TBA (1:2) rojo fluorescente. Para valorar el contenido de TBARS, modificamos el método de lectura para aumentar la sensibilidad, y lo adaptamos según el método de Richard et al. (1992) para su lectura fluorimétrica. Esto se llevó a cabo con el fluorímetro Perkin Elmer LS B50 a 515nm de excitación y 548nm de emisión con una rendija de excitación-emisión de 15-20nm.

Los TBARS se generan a partir de la oxidación enzimática del ácido araquidónico y, también, como producto final de la degradación oxidativa de algunos ácidos grasos poliinsaturados que poseen tres o más dobles enlaces. Por lo tanto, constituyen una medida indirecta de la lipoperoxidación de las membranas provocada por los RLO.

La curva patrón se calculó utilizando como estándar MDA, por lo cual los TBARS se expresaron en nmol equivalentes de MDA por gramo de hemoglobina, en el caso de los eritrocitos, y por miligramo de proteína o gramo de tejido, en el caso de la epidermis.

8.5 Técnicas microscópicas

8.5.1 Microscopía óptica visible

Las células de Langerhans fueron cuantificadas en un microscopio óptico equipado con una rejilla ocular. Se procesaron seis muestras de epidermis por animal para realizar este recuento y se analizaron entre 10 y 20 campos, de forma que el coeficiente de variabilidad fuese menor al 10%. El número de CL en cada rata se expresó en células/mm^2.

Respecto a la captación de imágenes para el estudio de la morfología celular, ésta se realizó en un microscopio Leitz Dialux 20, el cual llevaba asociada una cámara Olympus DP 10. El soporte de software utilizado fue el Soft Imaging System (analySIS).

8.5.2 Microscopía óptica de fluorescencia

Para poder observar las células de Langerhans en el microscopio óptico de fluorescencia se llevó a cabo una técnica inmunohistoquímica, utilizando un anticuerpo primario anti-S-100 de conejo. Para revelar el anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo secundario (anti-conejo) marcado con fluoresceína.

Se partió de una porción de epidermis, que se fijó con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente y se lavó tres veces con PBS. Luego, la piel se incubó 30 minutos con glicina 0,1M para eliminar los restos de fijador. Después de tres nuevos lavados con PBS, se permeabilizó la epidermis mediante incubación durante 3 horas con Tritón al 0,5% en una solución de BSA al 4% en PBS a temperatura ambiente. Seguidamente, se incubó el tejido con el anticuerpo primario anti-S-100 (Dako P-Z0311) a una dilución al 1/10000 durante toda una

noche a una temperatura de 4º C. La dilución del anticuerpo se hizo también con Tritón 0,5% en una solución de BSA al 4% en PBS, para potenciar la permeabilización.

Entre el anticuerpo primario y el secundario (Dako P-Z2422) se realizaron tres lavados con PBS.

El anticuerpo secundario se aplicó a una dilución del 1/300. La dilución de este anticuerpo también se realizó con Tritón al 0,5% en una solución de BSA al 4% en PBS, y el tiempo de incubación fue de una hora a temperatura ambiente.

Posteriormente se montaron las muestras de epidermis con Mowiol (ref. 475904 Calbiochem), para su observación al microscopio.

Las muestras se conservaron a oscuras a 4º C hasta que se solidificó bien el medio de montaje (24 horas), antes de su observación al microscopio óptico de fluorescencia.

La visualización y captación de las características morfológicas de las células se realizaron en un microscopio óptico de fluorescencia modelo Nikon Eclipse TE200 que lleva asociado una cámara WALLAC LSR Ultra Pix FKI 300 y mediante la utilización del software apropiado.

8.5.3 Microscopía electrónica

Se realizaron dos técnicas microscópicas:

A) Microscopía electrónica de rastreo (MER)

Para marcar de una forma específica las CL es necesario el revelado previo de las células de Langerhans mediante la tinción de la ATPasa. Una vez finalizada esta tinción y de manera consecutiva se procedió a los pasos específicos para preparar los fragmentos de epidermis para la microscopia electrónica. El protocolo llevado a cabo para visualizar este tipo celular mediante esta técnica fue el siguiente: (1) se realizó la fijación (1h a 4º C) en una mezcla 1:1 formada por 25ml de glutaraldehído al 3,4% - ácido pícrico al 0,30%, en un tampón cacodilato, y por 25ml de una solución de ácido ósmico al 4% en agua destilada (Takahashi, 1980); (2) post-fijación con acetato de uranilo acuoso; (3) deshidratación en batería de alcohol-

amilacetato; (4) desecación por la técnica del punto crítico con CO_2; (5) montaje en un soporte de aluminio; (6) con una cinta semiadhesiva se realizó la técnica llamada "stripping", que consiste en la separación de las capas superficiales de la muestra (en este caso epidermis) para así poder acceder a regiones más profundas del tejido donde se localizan las CL; (7) metalización con oro de 120nm de grosor.
Las muestras fueron examinadas con el microscopio electrónico de rastreo modelo JEOL 6400 15 KV, que lleva asociado el software de captación de imágenes INCA.

B) Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Para visualizar las células de Langerhans mediante el microscopio electrónico de transmisión, es necesario también el revelado previo de las células de Langerhans mediante la tinción de la ATPasa. Una vez finalizada esta tinción y de manera consecutiva se procedió a los pasos específicos para la preparación de los fragmentos de epidermis para la microscopia electrónica, de acuerdo con la técnica de Takahashi: (1) Fijación (1 hora a 4º C) en una mezcla 1:1 formada por 25ml de glutaraldehído al 3,4% - ácido pícrico al 0,30%, en un tampón cacodilato, y por 25ml de una solución de ácido ósmico al 4% en agua destilada; (2) lavado en tampón cacodilato y (3) post-fijación en una solución acuosa de acetato de uranilo al 1%. Después de la deshidratación de las muestras mediante una batería de alcoholes e incluidas en resina epoxi, se realizaron cortes semifinos de 0,7 µm para escoger la zona donde hacer los cortes ultrafinos de 60nm; una vez realizados, se examinaron los cortes ultrafinos contrastados con citrato de plomo (Reynolds, 1963) y acetato de uranilo bajo microscopio electrónico de transmisión modelo ZEISS 10CA 60KV (Hanau et al, 1986).

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El estudio estadístico se llevó a cabo utilizando el programa estadístico SPSS/PC+ versión 10.0

Se analizaron:

- La distribución de frecuencias de cada variable.
- Para variables cuantitativas continuas, las diferencias entre grupos se determinaron mediante las pruebas de comparación de medias, en el caso de dos grupos (prueba de Student-Fisher o de Mann-Whitney, dependiendo de la normalidad de la distribución), o mediante el análisis de la varianza (ANOVA) en el caso de más de dos grupos. El análisis de la varianza (ANOVA) se complementó con la prueba post hoc de Scheffé, para establecer las posibles diferencias entre parejas de grupos.
- Para variables discontinuas, se utilizaron pruebas no paramétricas (Mann-Whitney, para muestras no apareadas, o Wilcoxon, para muestras apareadas).
- En cada caso, se verificaron las condiciones de aplicación pertinentes: la prueba de Kolmogorov-Smirnov, para determinar la normalidad, y el análisis de la homogeneidad de varianzas, mediante la prueba de Snedecor.
- La relación entre dos variables cuantitativas se valoró, mediante el modelo de regresión lineal simple de Pearson.
- El análisis de regresión lineal múltiple (R^2) entre la variable dependiente (número de CL) y el resto de variables cuantitativas, sirvió para establecer el peso relativo de cada una de estas variables sobre la variable dependiente.
- El nivel de significación estadística, en todos los casos, se estableció a partir de $p=0,05$.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

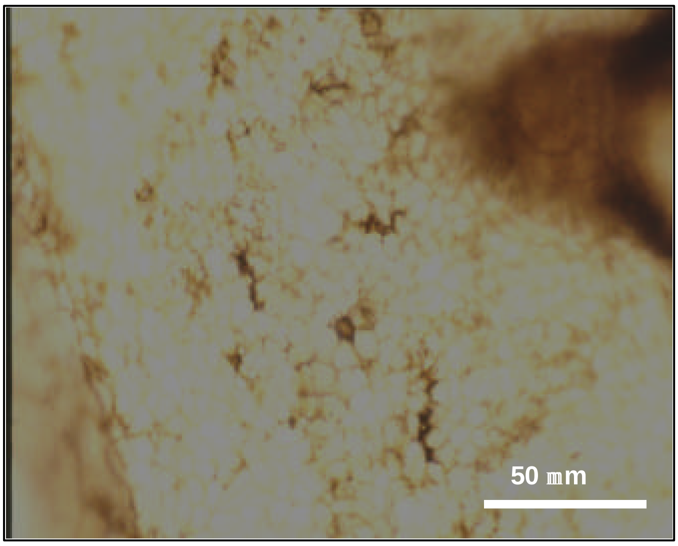
1. RESULTADOS DE LAS CÉLULAS DE LANGERHANS

Todas las técnicas microscópicas llevadas a cabo tenían como objetivo determinar o establecer un buen patrón de estudio de este tipo celular para así poder definir con mayor claridad las alteraciones de estas células producidas por parte de la radiación ultravioleta y aplicar este conocimiento en la determinación experimental de los FPS de los filtros solares.

1.1. *Microscopía óptica visible (MOV)*

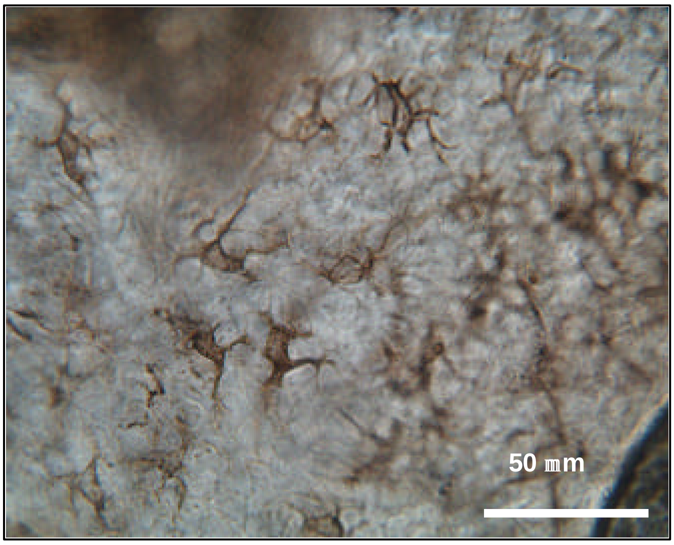
Para tener una visión general de las CL y de sus alteraciones, se llevó a cabo una tinción específica basada en la presencia de una ATPasa de membrana, característica de las células de Langerhans. De esta forma se pudieron determinar el número de CL y sus características morfológicas.
Aunque en el protocolo inicial de la técnica histoquímica se utiliza el ATP como sustrato de la reacción, la utilización del ADP como alternativa a este sustrato da unos mejores resultados en rata *hairless*, obteniéndose imágenes más nítidas en las cuales se ha eliminado el ruido de fondo que representaba la tinción inespecífica de los queratinocitos (Chaker et al, 1984).
Además, otra modificación introducida en el protocolo ha hecho que obtengamos un menor número de precipitados, ya que se han optimizado los posteriores lavados al proceso de tinción con sulfuro de amonio.
Esta variación consiste en lavar las epidermis en agitación dentro de unos viales llenos de pequeñas bolas de vidrio y realizándose los lavados en agitación.

A continuación podemos observar las mejoras conseguidas mediante la optimización del protocolo:



- Menor definición de las células de Langerhans
- Ruido de fondo
- Interferencia de los precipitados
- Interferencia de los queratinocitos

Figura 22. Células de Langerhans de rata control a 400x utilitzando ATP en la tinción (MOV).



- Imagen más nítida
- Mayor definición de la morfología celular

Figura 23. Células de Langerhans a 400x de rata control pseudoirradiada 3 meses (MOV).

La utilización de estas modificaciones técnicas permite determinar con mayor claridad el número de células de Langerhans así como sus características morfológicas.

1.1.1. Recuento de células de Langerhans

1.1.1.1. Irradiación aguda

A continuación mostramos el recuento de las células de Langerhans en las diferentes irradiaciones agudas (Tabla 6), así como la significación entre las diferentes dosis de radiación y entre animales tratados y control (Tabla 7) (la significación es la obtenida a partir del test estadístico de la prueba de Scheffé, generado en el ANOVA).

	CONTROL	1 DEM	1,25 DEM	1,56 DEM
Células Langerhans/mm^2	563 ± 26	433 ± 39	399 ± 43	435 ± 41

Tabla 6. Media ± desviación estándar del número de células de Langerhans para las distintas dosis de tratamiento agudo con RUV. n = 7 para cada grupo.

CONTROL		**CONTROL**		**CONTROL**
<0,001		<0,001		<0,001
IRR.1,25 DEM	NS	**IRR. 1 DEM**	NS	**IRR.1,56 DEM**
		NS		

Tabla 7. Significación entre los tratamientos y control, y entre los tratamientos entre sí del número de células de Langerhans, correspondiente a la tabla 6.

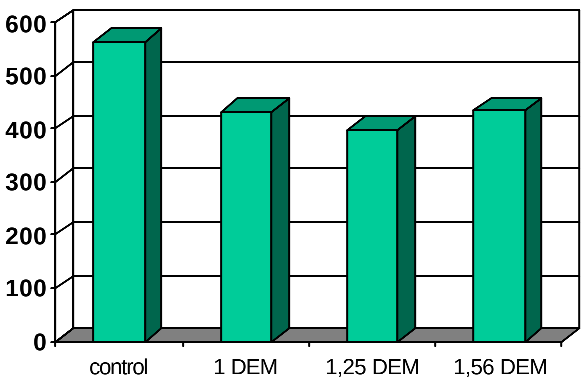


Figura 24. Representación gráfica de la disminución del número de células de Langerhans en función de las diferentes dosis de RUV.

Observamos una disminución significativa respecto al control en los tres niveles de tratamiento (Figura 24). El porcentaje de disminución fue de un 23,09% a 1 DEM y a 1,25 DEM esta disminución fue de una magnitud del 29,12% y en la tercera dosis de tratamiento (1,56 DEM) esta disminución fue de un 22,73%.

1.1.1.2. Irradiación crónica

En las tablas 8, 9 y 10 se muestra el recuento de las células de Langerhans en las diferentes irradiaciones crónicas, así como las diferencias significativas entre el grupo control e irradiado para cada dosis de radiación (la significación se obtuvo a partir del test estadístico T-Student).

2 MESES	CONTROL	*p*	IRRADIADO 0,71 DEM
Células Langerhans/mm^2	707 ± 92	NS	592 ± 108

Tabla 8. Media ± desviación estándar del número de células de Langerhans en la irradiación crónica de 0,71 DEM durante 2 meses. n = 6 en cada grupo.

3 MESES	CONTROL	*p*	IRRADIADO 0,5 DEM
Células Langerhans/mm^2	883 ± 100	NS	760 ± 111

Tabla 9. Media ± desviación estándar del número de células de Langerhans en la irradiación crónica de 0,5 DEM durante 3 meses. n = 6 en cada grupo.

5 MESES	CONTROL	*p*	IRRADIADO 0,61 DEM
Células Langerhans/mm^2	776 ± 137	NS	699 ± 104

Tabla 10. Media ± desviación estándar del número de células de Langerhans en la irradiación crónica de 0,61 DEM durante 5 meses. n = 6 en cada grupo.

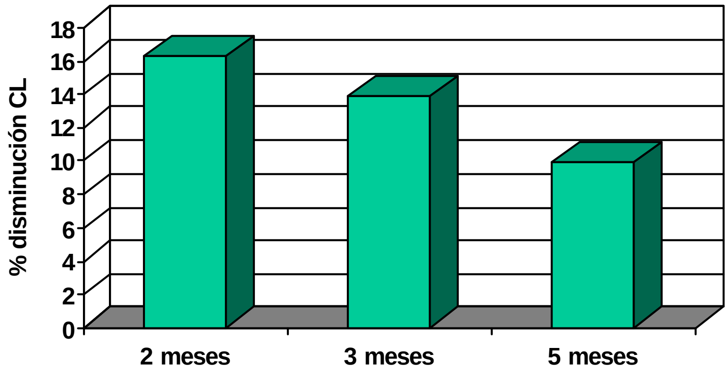


Figura 25. Representación gráfica de la disminución del número de células de Langerhans en función de los diferentes tiempos de irradiación crónica.

Respecto a la irradiación crónica, aunque no fueron significativas las diferencias obtenidas, observamos una tendencia a la disminución que en el caso de la irradiación crónica de 2 meses tuvo una magnitud del 16,26%, para una irradiación crónica de 3 meses la disminución es de un 14% y para una irradiación crónica de 5 meses esta disminución fue de un 9,92%.

En las irradiaciones crónicas se utilizó un control para cada patrón de irradiación (2, 3 y 5 meses). Esto fue debido a que, a diferencia de las irradiaciones agudas en las que el tratamiento desde un punto de vista de manipulación fue muy similar en todos los niveles (1, 1,25 y 1,56 DEM), para irradiaciones a largo plazo el proceso de manipulación varió mucho en función del patrón de irradiación aplicado (2, 3 y 5 meses respectivamente), así como la edad de la rata.
Es obvio pues, que no podemos comparar un animal que ha sido manipulado 2 meses con un grupo control el cual ha sufrido una manipulación de 5 meses. Como vemos en los resultados, las ratas de más de dos meses tienen mayor número de células de Langerhans que las ratas jóvenes de 8 semanas, utilizadas en los experimentos de irradiación aguda.

El hecho que la disminución en el número de células de Langerhans en las ratas irradiadas crónicamente no sea estadísticamente significativo, al contrario de lo que sucede en las irradiaciones agudas, se puede explicar por el hecho que la irradiación

crónica posiblemente induzca una estimulación sobre la médula ósea y se genera un número mayor de células dendríticas precursoras de las células de Langerhans.
Este efecto estimulador no se manifiesta en las pautas de irradiación aguda. Este fenómeno es de un gran interés clínico y patológico y es objeto de un nuevo proyecto de investigación de nuestro grupo.

1.1.2. Características morfológicas de las células de Langerhans

Se estudiaron, utilizando la microsocopía óptica visible, los parámetros morfológicos de las células de Langerhans, teñidas mediante la técnica de la ATPasa. A continuación se exponen las imágenes obtenidas tanto en animales control como en animales irradiados:

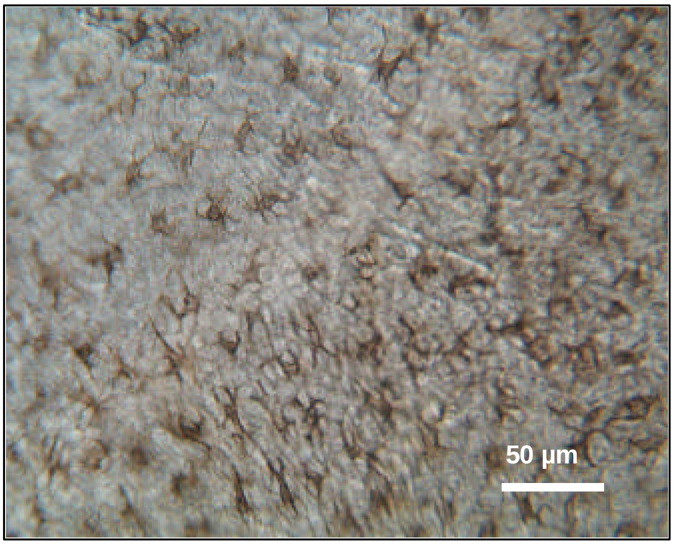


Figura 26. Células de Langerhans a 200x del grupo control pseudoirradiado 0,5 DEM y sacrificado a los 3 meses (MOV).

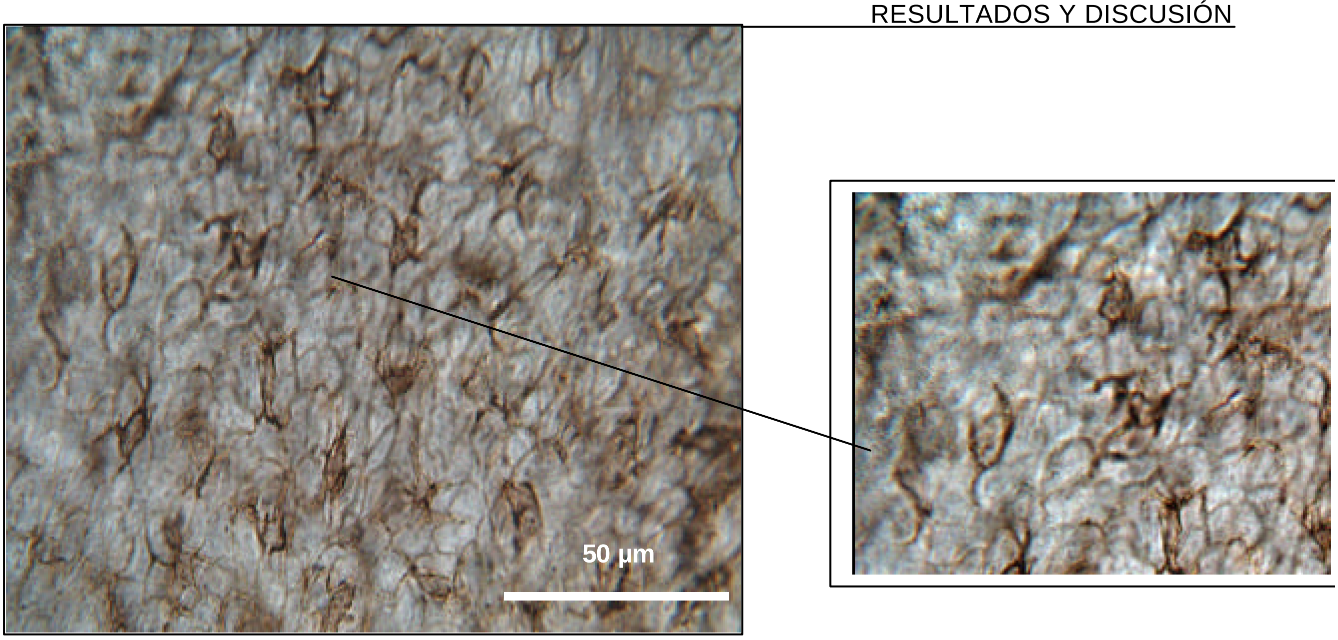


Figura 27: Células de Langerhans a 400x del grupo control pseudoirradiado 0,5 DEM y sacrificado a los 3 meses (MOV); al lado detalle de las CL control.

Podemos observar las características de estas células. La tinción hace que adopten una coloración marrón permitiéndonos observar su característica forma estrellada y con abundantes prolongaciones dendríticas. Estas células tienen una amplia distribución y se disponen entre los queratinocitos.

Los resultados obtenidos en los animales irradiados fueron los siguientes:

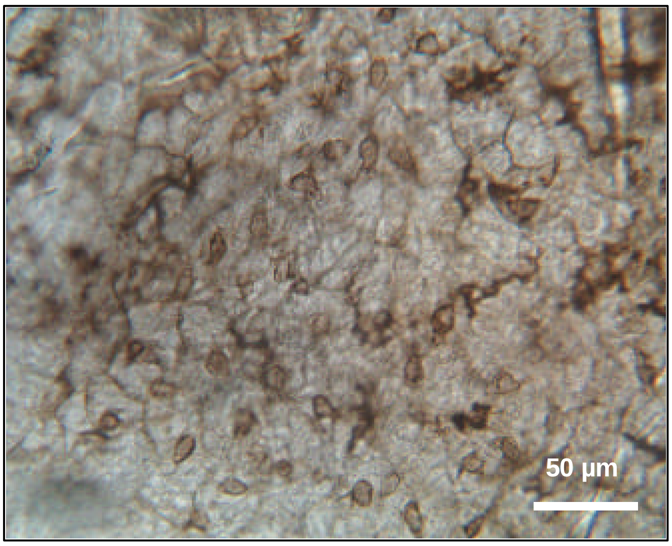


Figura 28. Células de Langerhans a 200x del grupo irradiado 0,5 DEM y sacrificado a los 3 meses (MOV).

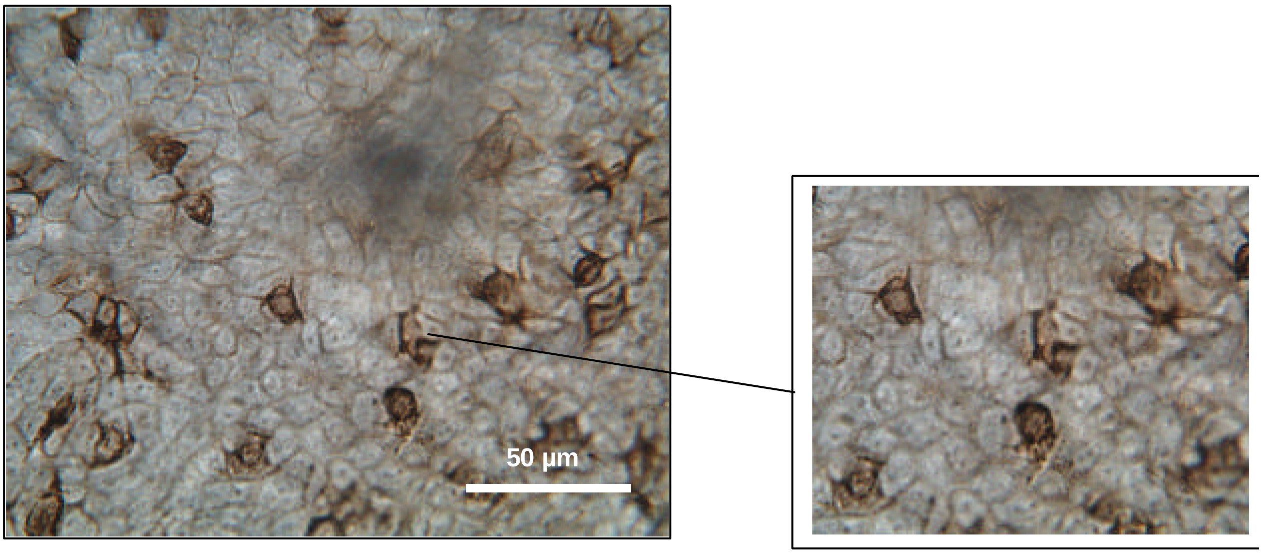


Figura 29. Células de Langerhans a 400x de rata irradiada 0,5 DEM y sacrificada a los 3 meses (MOV); al lado detalle de CL irradiada.

Observamos que en los grupos irradiados las diferencias son evidentes. En comparación con el grupo control obtuvimos un menor número de células y su forma varió de una forma importante, ya que observamos una disminución considerable tanto en el número de dendritas como en su longitud, así como un redondeamiento de las células que ya no muestran la característica forma estrellada observada en los grupos control.

Este hecho, desencadenado por la radiación ultravioleta, está relacionado con la pérdida de las funciones de estas células, que como hemos visto en la introducción puede desembocar en patologías importantes.

En general la microscopía óptica visible nos permite hacer un recuento celular, ver la forma y perfil de las células, medir el tamaño y poder valorar la longitud de las dendritas.

1.2 *Microscopía óptica de fluorescencia (MOF)*

Con la intención de complementar los resultados obtenidos mediante microscopía óptica visible, se realizaron también técnicas de inmunohistoquímica. En concreto, se realizó la tinción específica de este tipo celular en epidermis fresca con el anticuerpo S-100, utilizándose como secundario un anticuerpo conjugado con la fluoresceína.

Previamente a esta técnica, se habían realizado técnicas para observar estas células en el microscopio óptico en muestras de piel incluídas en parafina de ratas *hairless*, y utilizándose el mismo anticuerpo primario (S-100) y un secundario conjugado a la peroxidasa.

Los resultados obtenidos utilizando esta técnica en cortes de parafina nos permitían visualizar las células de Langerhans, pero éstos no eran lo suficientemente satisfactorios desde el punto de vista de la observación, con cierto detalle, de las características morfológicas así como el recuento de dichas células.

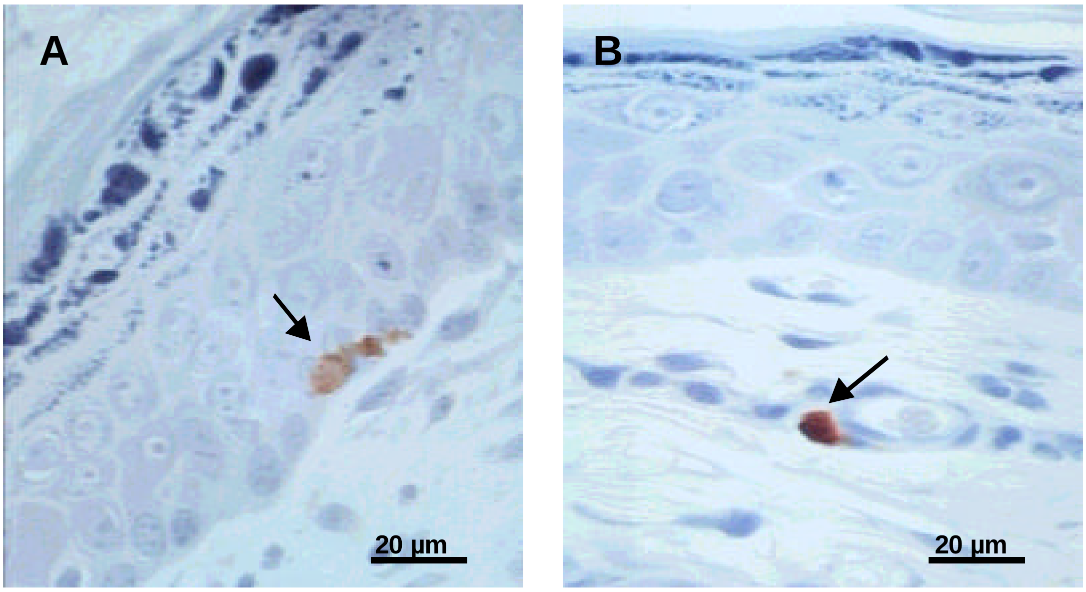


Figura 30. Inmunotinción de células de Langerhans en epidermis de rata *hairless* incluida en parafina. Corte sagital tratado con anticuerpo S-100 y revelado mediante la reacción de la peroxidasa. En A, célula de Langerhans individual puede ser observada en la epidermis cercana a la capa basal (flecha). En B, una célula S-100 positiva aparece en la parte superior de la dermis (flecha). Esta célula posiblemente sea una célula de Langerhans en migración. Aumentos: 400x.

Por ello que se optó por realizar la técnica sobre epidermis fresca, obteniéndose unos resultados muy satisfactorios.

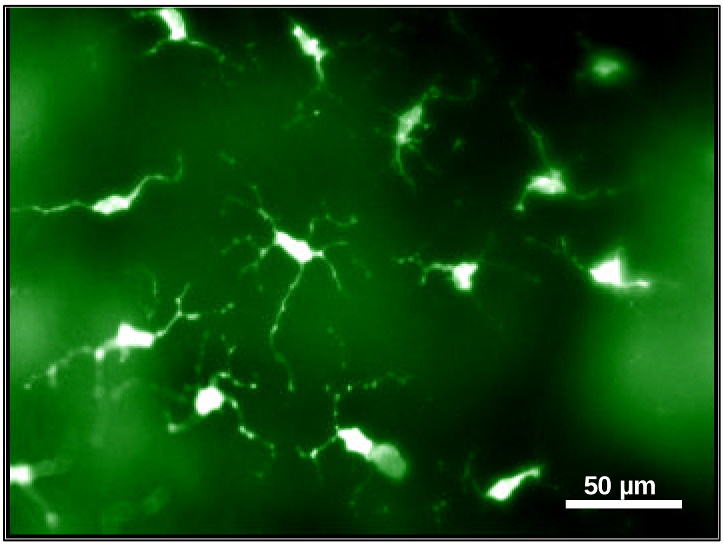


Figura 31 Células de Langerhans a 200x del grupo control pseudoirradiado 0,5 DEM y sacrificado a los 3 meses (MOF).

Se realizó esta metodología de una forma paralela a las otras técnicas microscópicas de forma que obtenemos una amplia información, como resultado de la aplicación de diferentes técnicas, sobre las células de Langerhans de los mismos individuos.

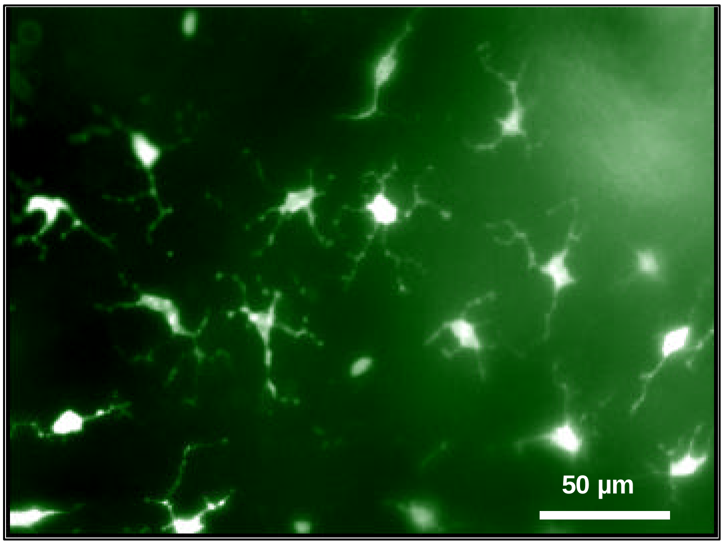


Figura 32. Células de Langerhans a 200x de grupo control pseudoirradiado 0,5 DEM y sacrificado a los 3 meses (MOF).

Los resultados obtenidos en animales irradiados fueron los siguientes:

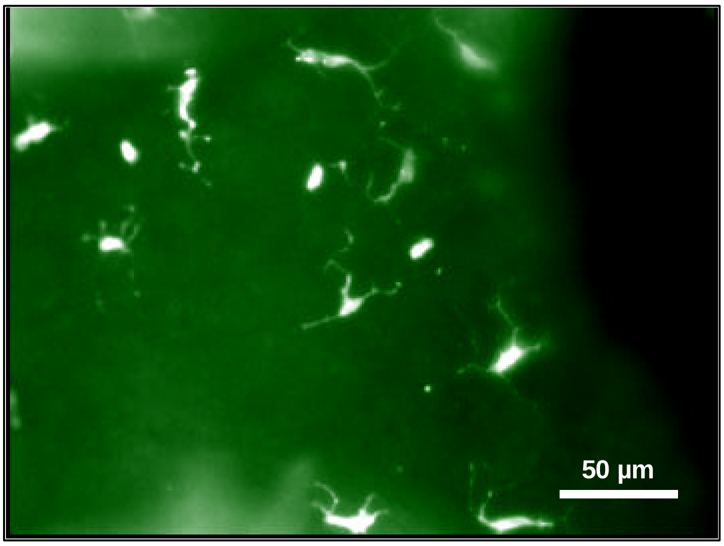


Figura 33. Células de Langerhans a 200x grupo irradiado 0,5 DEM y sacrificado a los 3 meses (MOF).

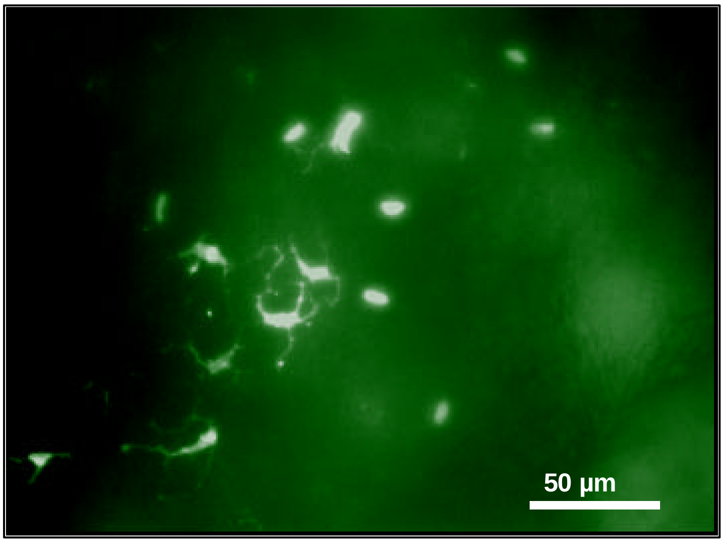


Figura 34. Células de Langerhans a 200x del grupo irradiado 0,5 DEM y sacrificado a los 3 meses (MOF).

La gran especificidad de esta técnica nos permite observar con mayor claridad las diferencias de tamaño y forma de las células, así como el número y longitud de dendritas entre los animales irradiados y los controles.

Observamos que en las pieles control las células presentan un mayor número de dendritas y éstas tienen más ramificaciones y son de mayor longitud.
Mientras que los grupos irradiados, al igual que observábamos en microsocopía óptica, tienen un menor tamaño, son más redondeadas y las pocas dendritas que presentan son de menor longitud.

1.3 Microscopía electrónica (ME)

Para intentar relacionar los cambios morfológicos con los posibles cambios ultraestructurales se realizaron técnicas de microscopía electrónica.
Mediante estas técnicas se intentó observar las diferencias a nivel de estructuras celulares (membranas, núcleos, gránulos de Birbeck, etc.), entre las células control y las irradiadas, para relacionarlo con las diferencias respecto a la morfología celular observadas mediante las dos técnicas anteriores.
Estas técnicas también permiten observar en detalle el cambio de morfología característico en función de la irradiación.
Se han realizado dos técnicas de microscopía electrónica:

- Microscopía electrónica de transmisión (MET)

- Microscopía electrónica de rastreo (MER)

1.3.1 Microscopía electrónica de transmisión (MET).

Intentamos observar la ultraestructura celular característica de estas células y determinar los posibles cambios en función de la irradiación.

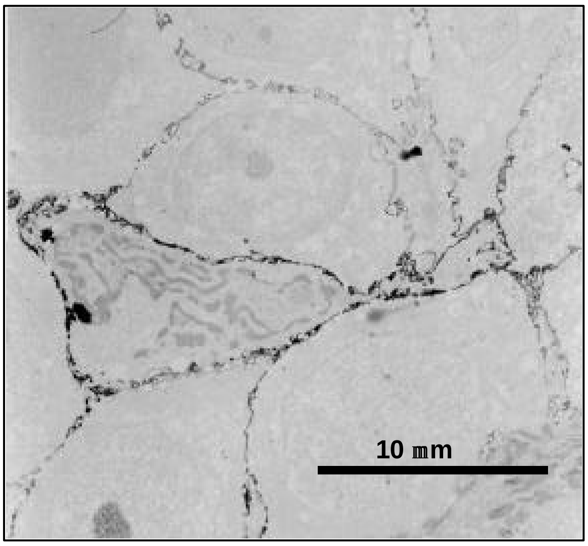


Figura 35. Célula de Langerhans a 3150x de grupo control pseudoirradiado 0,71 DEM y sacrificado a los 2 meses (MET).

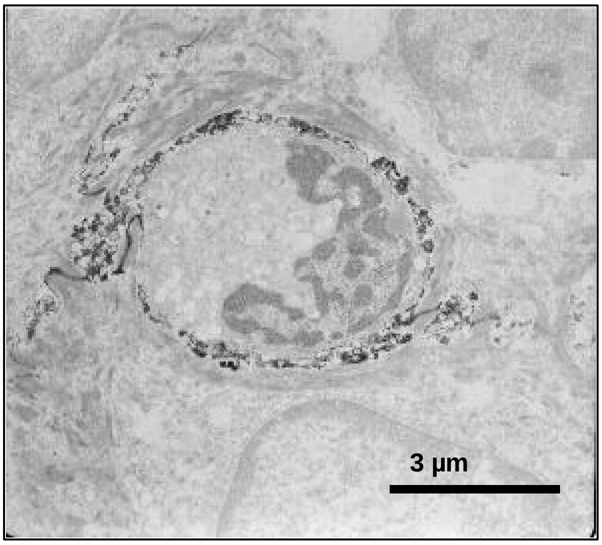


Figura 36. Célula de Langerhans a 8000x de grupo irradiado 0,71 DEM y sacrificado a los 2 meses (MET).

Podemos observar el contorno de la célula gracias a los precipitados de nitrato de plomo que se disponen en la membrana, éste es el fundamento del revelado de las

células de Langerhans, a través de la tinción que aprovecha la función de la ATPasa de membrana.

Observamos también una clara diferencia en la forma de estas células en función de la irradiación; las células irradiadas tienen una forma mucho más redondeada que las células control, así como una mayor vacuolización citoplasmática y picnosis nuclear.

1.3.2 Microscopía electrónica de rastreo (MER).

Mediante esta técnica, no observamos la ultraestructura celular, sino que determinamos, en detalle, la forma diferenciada de estas células en función de la irradiación, así como la longitud y recorrido de sus dendritas.

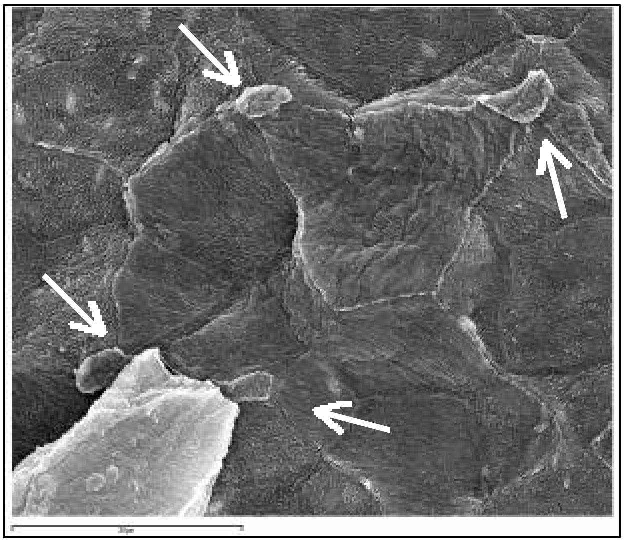


Figura 37. Células de Langerhans a 1500x del grupo control.

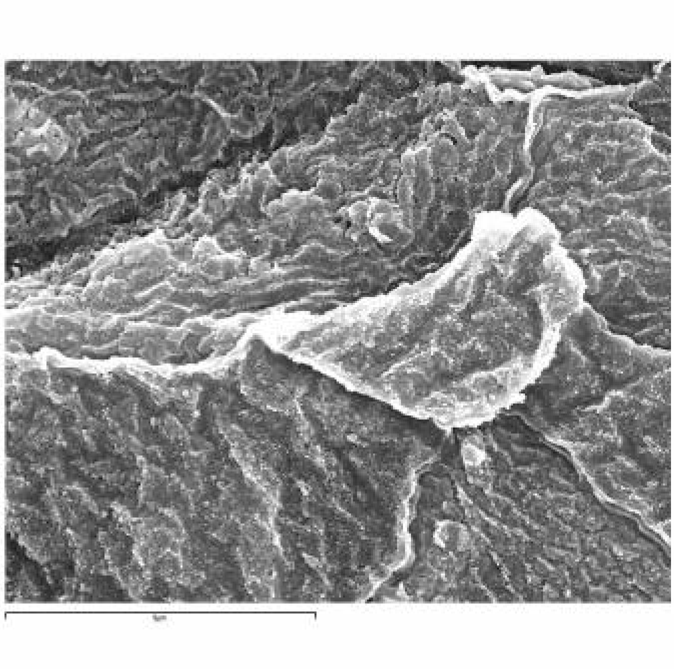


Figura 38: Detalle a 6000x de célula Langerhans de la figura 37 (MER).

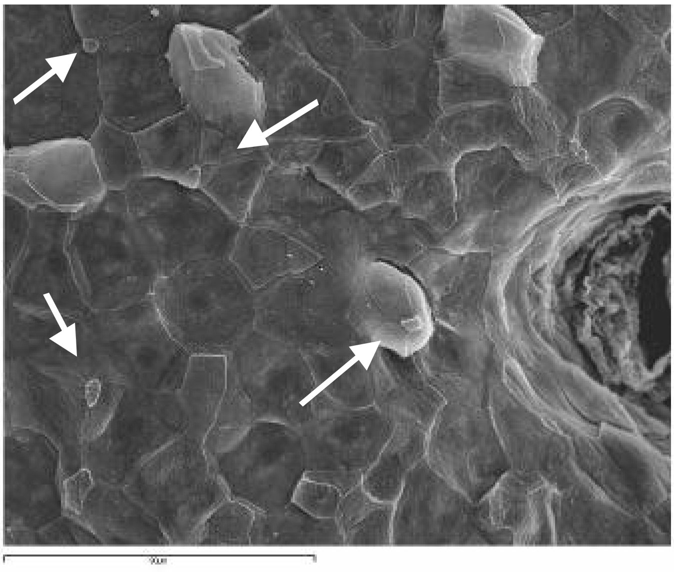


Figura 39: Células de Langerhans a 1000x de grupo irradiado con 1,25 DEM.

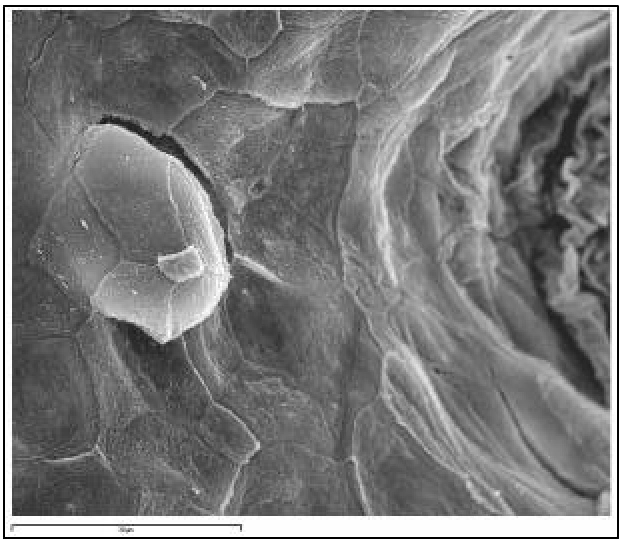


Figura 40. Detalle a 1500x de célula de Langerhans de la figura 39 (MER).

Como podemos observar, la microscopía electrónica permite valorar determinados parámetros específicos de las células de Langerhans que no son asequibles con otras técnicas de microscopía óptica. En nuestro trabajo aún no hemos podido obtener conclusiones definitivas respecto las posibles diferencias entre las muestras de ratas control e irradiadas. En este apartado nos interesa destacar que además de la disminución del número de células en los animales irradiados (bien valorable mediante la microscopía óptica visible y de fluorescencia), la microscopía de fluorescencia y la microscopía electrónica de transmisión ponen en evidencia que en los animales irradiados crónicamente hay: una disminución en el número y longitud de las prolongaciones dendríticas, una vacuolización del citoplasma y una picnosis nuclear, en comparación con los animales control.

2. RESULTADOS RELATIVOS A LOS RLO EN IRRADIACIONES AGUDAS

Para facilitar el análisis de los resultados no se ha entrado directamente a discutir globalmente estos datos, sino que se ha hecho una primera exposición donde se comparan de una forma consecutiva los diferentes grupos de tratamiento respecto al control.

Estos datos, que cumplen los criterios de normalidad y han sido generados mediante la realización de un test ANOVA y la realización de una prueba Scheffé como prueba post-hoc, se representan en forma de media ± desviación estándar.

La significación estadística es la obtenida en el test estadístico de Scheffé, ya que posteriormente se analizarán los mismos datos de una forma general para intentar hallar tendencias o patrones de comportamiento en función de la irradiación. Es en este segundo análisis más general donde se realiza una discusión de los resultados.

2.1 Resultados del tratamiento con 1 DEM

SANGRE

	CONTROL	p	1 DEM
GST total µmol/min/g Hb	**640,14±88,55**	**<0,001**	**939,57±117,32**
GST 52º µmol/min/g Hb	**43,8±11,55**	**<0,001**	**95,28±18,17**
Residual %	**6,76±1,05**	**<0,001**	**10,09±1,21**
GSH eritrocito µmol/g Hb	**5,25±0,44**	**0,001**	**3,91±0,70**
GSSG eritrocito µmol/g Hb	**1,19±0,15**	**<0,001**	**0,79±0,13**
GSH/GSSG eritrocito	**4,45±0,63**	**NS**	**5,05±1,29**
TBARS eritrocito nmol/g Hb	**3,92±1,20**	**NS**	**3,71±0,74**
CAT mmol/min/g Hb	**108,23±9,00**	**NS**	**108,34±15,46**
GPx mmol/min/g Hb	**12,33±1,25**	**<0,001**	**20,86±3,03**
GR µmol/min/g Hb	**218,63±66,27**	**NS**	**145,29±22,59**
SOD U/g Hb	**2756,86±922,27**	**NS**	**2445,71±451,89**
GSH plasma nmol/ml	**20,41±2,19**	**<0,001**	**11,59±3,08**
GSSG plasma nmol/ml	**42,90±5,47**	**NS**	**35,68±5,33**
GSH/GSSG plasma	**0,48±0,071**	**0,022**	**0,32±0,089**
TBARS plasma nmol/ml	**2,3129±0,50**	**NS**	**2,06±0,24**

Tabla 11. Resultados de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo en eritrocitos con un tratamiento de 1 DEM. n = 7 en cada grupo.

GST: La actividad GST total y termoestable (52 ºC) aumentó significativamente respecto al control, observándose un incremento de un 46% respecto al control en la actividad total de la GST y un incremento de un 117% en el caso de la termoestable. El porcentaje de la GST residual también aumentó significativamente.

GSH y GSSG: Las dos formas de glutatión eritrocitario disminuyeron significativamente después de la exposición equivalente a 1 DEM de radiación ultravioleta. En el caso del glutatión reducido (GSH), la disminución fue de un 25,52%, mientras que el glutatión oxidado (GSSG) presentó una disminución de un 33,61%.
En el caso del plasma, sólo se observó esta disminución significativa en el caso del GSH, hallándose que el GSH plasmático disminuyó en un 43,21% respecto al lote no irradiado. Esta disminución del GSH afectó también al cociente GSH/GSSG, que también disminuyó significativamente en los animales irradiados.

TBARS: No hubo diferencias significativas de este parámetro respecto al grupo control ni en eritrocitos ni en plasma.

Otras enzimas: La actividad CAT, GR y SOD no varió significativamente en el caso de 1DEM, respecto al grupo control; mientras que la actividad GPx presentó un aumento de un 69,2%.

EPIDERMIS

	CONTROL	p	1 DEM
GST nmol/min/mg prot	**6,15±1,54**	**<0,001**	**16,74±3,70**
GST nmol/min/g tej.	**263,9±93,22**	**<0,001**	**679,10±183,34**
CAT µmol/min/mg prot	**50,72±7,96**	**0,023**	**65,11±9,16**
CAT µmol/min/g tej.	**2,13±0,42**	**NS**	**2,61±0,29**
TBARS nmol/mg prot	**81,38±13,21**	**NS**	**66,21±9,57**
TBARS nmol/g tej.	**3,39±0,51**	**NS**	**2,68±0,52**
GSH nmol/ mg prot	**13,98±2,66**	**<0,001**	**5,44±1,52**
GSH nmol/g tej.	**591,98±158,24**	**<0,001**	**217,81±57,14**
GSSG nmol/ mg prot	**26,04±3,52**	**<0,001**	**14,48±1,78**
GSSG nmol/g tej.	**1082,71±75,23**	**<0,001**	**583,4±76,92**
GSH/GSSG	**0,55±0,15**	**NS**	**0,38±0,13**
GPx µmol/min/mg prot	**35,27±6,31**	**NS**	**35,05±4,07**
GPx µmol/min/g tej.	**1475,14±253,68**	**NS**	**1410,43±160,21**
GR µmol/min/mg prot	**11,11±1,76**	**NS**	**13,71±1,61**
GR µmol/min/g tej.	**467,71±93,69**	**NS**	**550,71±48,07**
SOD U/mg prot	**9,74±3,21**	**NS**	**13,31±4,73**
SOD U/g tej.	**402,29±102,54**	**NS**	**529,43±161,80**
Proteínas mg prot/g tej.	**42,15±5,98**	**NS**	**40,36±3,22**

Tabla 12. Resultados analíticos de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo en epidermis con un tratamiento de 1 DEM. n = 7 en cada grupo.

GST: al igual que en eritrocitos, hallamos un aumento significativo respecto a la actividad de esta enzima. Este aumento lo hallamos tanto si lo expresamos por g de

tejido como si lo expresamos por mg de proteínas. La magnitud del aumento fue de un 172% en mg de proteína y de un 157,8% si lo expresamos por gramo de tejido.

CAT: respecto a la actividad CAT, vemos que su significación estadística varía en función de su representación (por mg de proteína o por g de tejido).

TBARS: al igual que lo que sucedía en sangre, no se observó ninguna variación significativa respecto al control en este parámetro.

GSH y GSSG: los niveles de glutatión reducido siguen el mismo patrón que en sangre, es decir, sufren una disminución respecto al control, esta disminución fue de un 61% si lo expresamos por mg de proteína y de un 63,2% si lo expresamos por gramo de tejido. Lo mismo sucede en el caso del glutatión oxidado, disminuyendo un 44,4% si lo expresamos por mg de proteína y de un 46% si lo expresamos en función de tejido.

Otras enzimas: las actividades GR, GPx y SOD no fueron significativamente diferentes entre el control y el tratamiento con 1 DEM.

Proteínas: No varió significativamente el contenido de proteínas en función de la irradiación con 1 DEM.

2.2 Resultados del tratamiento con 1,25 DEM

SANGRE

	CONTROL	p	1,25 DEM
GST total µmol/min/g Hb	**640,14±88,55**	**<0,001**	**991,66±64,38**
GST 52º µmol/min/g Hb	**43,8±11,55**	**NS**	**65,46±8,48**
Residual %	**6,76±1,05**	**NS**	**6,59±0,68**
GSH eritrocito µmol/g Hb	**5,25±0,44**	**NS**	**4,74±0,33**
GSSG eritrocito µmol/g Hb	**1,19±0,15**	**<0,001**	**0,48±0,086**
GSH/GSSG eritrocito	**4,45±0,63**	**<0,001**	**10,16±2,25**
TBARS eritrocito nmol/g Hb	**3,92±1,20**	**NS**	**3,59±0,55**
CAT mmol/min/g Hb	**108,23±9,00**	**NS**	**125,68±11,29**
GPx mmol/min/g Hb	**12,33±1255,87**	**<0,001**	**23,73±2819,54**
GR µmol/min/g Hb	**218,63±66,27**	**NS**	**183,02±43,89**
SOD U/g Hb	**2756,86±922,27**	**NS**	**3130,57±251,04**
GSH plasma nmol/ml	**20,41±2,19**	**NS**	**17,17±4,62**
GSSG plasma nmol/ml	**42,90±5,47**	**NS**	**46,78±8,67**
GSH/GSSG plasma	**0,48±0,071**	**NS**	**0,36±0,072**
TBARS plasma nmol/ml	**2,3129±0,50**	**NS**	**2,43±0,29**

Tabla 13. Resultados de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo en eritrocitos con un tratamiento de 1,25 DEM. n = 7 en cada grupo.

GST: la actividad total de este enzima aumentó significativamente un 55% respecto al control; por otro lado, la diferencia observada entre la actividad GST termoestable control y la GST termoestable 1,25 DEM no fue estadísticamente significativa.

GSH y GSSG: los niveles eritrocitarios y plasmáticos de GSH no fueron significativamente diferentes en este modelo de tratamiento, mientras que observamos una disminución significativa de una magnitud del 60% en el caso del glutatión oxidado eritrocitario. Esto determinó un aumento significativo del cociente GSH/GSSG eritrocitario.

TBARS: el contenido de TBARS eritrocitario y plasmático no fue estadísticamente diferente respecto al control.

Otras enzimas: se observó un aumento significativo de un 92% en la actividad GPx que contrasta con la no significación en las variaciones de las actividades de las enzimas GR, CAT y SOD.

EPIDERMIS

	CONTROL	p	1,25 DEM
GST nmol/min/mg prot	**6,15±1,54**	**0,022**	**11,47±3,28**
GST nmol/min/g tej.	**263,9±93,22**	**NS**	**459,52±125,10**
CAT µmol/min/mg prot	**50,72±7,96**	**<0,001**	**77,52±8,65**
CAT µmol/min/mg prot	**2,13±0,42**	**<0,001**	**3,11±0,27**
TBARS nmol/mg prot	**81,38±13,21**	**NS**	**75,37±19,86**
TBARS nmol/g tej.	**3,39±0,51**	**NS**	**3±0,65**
GSH nmol/ mg prot	**13,98±2,66**	**0,001**	**8,26±2,51**
GSH nmol/g tej.	**591,98±158,24**	**0,004**	**334,42±111,39**
GSSG nmol/ mg prot	**26,04±3,52**	**<0,001**	**15,75±2,19**
GSSG nmol/g tej.	**1082,71±75,23**	**<0,001**	**636,27±111,23**
GSH/GSSG	**0,55±0,15**	**NS**	**0,52±0,11**
GPx µmol/min/mg prot	**35,27±6,31**	**NS**	**29,88±3,93**
GPx µmol/min/g tej.	**1475,14±253,68**	**NS**	**1201,29±155,33**
GR µmol/min/mg prot	**11,11±1,76**	**NS**	**13,11±2,18**
GR µmol/min/g tej.	**467,71±93,69**	**NS**	**526±75,75**
SOD U/mg prot	**9,74±3,21**	**NS**	**10,34±1,68**
SOD U/g tej.	**402,29±102,54**	**NS**	**413,57±49,70**
Proteínas mg prot/g tej.	**42,15±5,98**	**NS**	**40,25±2,16**

Tabla 14. Resultados de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo en epidermis con un tratamiento de 1,25 DEM. n = 7 en cada grupo.

GST: hallamos un aumento significativo de la actividad GST de un 86,5% en el caso de referirlo en mg de proteína, ya que el aumento de actividad de esta enzima expresado por g de tejido no fue significativo.

CAT: se observó un incremento significativo de la actividad enzimática de esta enzima tanto si lo expresamos por mg de proteína (52,8%) como si lo expresamos por g de tejido (46%).

TBARS: las variaciones observadas de este parámetro no fueron estadísticamente diferentes.

GSH y GSSG: se observaron disminuciones significativas en ambos tipos de glutationes (reducido y oxidado) tanto si lo expresamos por mg de proteína como si lo hacemos por g de tejido. De forma que hubo una disminución del 41% de GSH por mg de proteína y del 43,5% si lo referimos a g de tejido. Respecto al GSSG, si hacemos referencia a mg de proteína la disminución fue del 39,5%, mientras que si lo hacemos por g de tejido esta reducción del nivel de glutatión oxidado fue del 41,2%.

Otras enzimas: Las variaciones en las actividades enzimáticas de GPx, GR y SOD no fueron significativamente diferentes.

Proteínas: el contenido de proteína no varió de una forma significativa en función de la irradiación (1,25 DEM).

2.3 Resultados del tratamiento con 1,56 DEM

SANGRE

	CONTROL	p	1,56 DEM
GST total µmol/min/g Hb	**640,14±88,55**	**NS**	**660,28±111,07**
GST 52º µmol/min/g Hb	**43,8±11,55**	**NS**	**56,78±15,87**
Residual %	**6,76±1,05**	**NS**	**8,55±1,64**
GSH eritrocito µmol/g Hb	**5,25±0,44**	**NS**	**4,73±0,49**
GSSG eritrocito µmol/g Hb	**1,19±0,15**	**0,007**	**0,90±0,16**
GSH/GSSG eritrocito	**4,45±0,63**	**NS**	**5,36±1,08**
TBARS eritrocito nmol/g Hb	**3,92±1,20**	**NS**	**5,43±1,47**
CAT mmol/min/g Hb	**108,23±9,00**	**0,003**	**134,13±7,02**
GPx mmol/min/g Hb	**12,33±1255,87**	**<0,001**	**21,95±3356,09**
GR µmol/min/g Hb	**218,63±66,27**	**NS**	**223,94±56,99**
SOD U/ g Hb	**2756,86±922,27**	**NS**	**3143,86±205,33**
GSH plasma nmol/ml	**20,41±2,19**	**NS**	**23,70±2,79**
GSSG plasma nmol/ml	**42,90±5,47**	**NS**	**35,95±3,09**
GSH/GSSG plasma	**0,48±0,071**	**0,005**	**0,66±0,0971**
TBARS plasma nmol/ml	**2,3129±0,50**	**<0,001**	**3,59±0,40**

Tabla 15. Resultados de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo en eritrocitos con un tratamiento de 1,56 DEM. n = 7 en cada grupo.

GST: no hallamos diferencias significativas en las actividades de la GST total y GST termoestable (52º C).

GSH y GSSG: respecto al glutatión eritrocitario reducido (GSH), la variación observada no fue significativa; por otro lado en el caso del glutatión eritrocitario oxidado (GSSG) obtuvimos una disminución significativa de su cantidad en el tratamiento de 1,56 DEM. Esta disminución fue de un 24,3%. En el plasma, las variaciones observadas no fueron significativas en ninguno de los dos tipos de glutatión, aunque la disminución del GSSG fue superior, determinando un aumento significativo del cociente GSH/GSSG.

TBARS: no hubo diferencias significativas de este parámetro en eritrocitos, pero sí que observamos un aumento significativo de TBARS en plasma. Este aumento fue de un 55,4% respecto al control.

Otras enzimas: observamos un aumento significativo en las actividades de las enzimas CAT (19,3%) y GPx (78%), mientras que las diferencias observadas en las actividades enzimáticas de GR y SOD no fueron estadísticamente significativas.

EPIDERMIS

	CONTROL	p	1,56 DEM
GST nmol/min/mg prot	**6,15±1,54**	**0,032**	**11,21±2,72**
GST nmol/min/g tej.	**263,9±93,22**	**0,018**	**506,88±96,09**
CAT µmol/min/mg prot	**50,72±7,96**	**0,017**	**65,72±5,55**
CAT µmol/min/mg prot	**2,13±0,42**	**0,001**	**3,01±0,28**
TBARS nmol/mg prot	**81,38±13,21**	**<0,001**	**119,18±10,95**
TBARS nmol/g tej.	**3,39±0,51**	**<0,001**	**5,47±0,67**
GSH nmol/mg prot	**13,98±2,66**	**NS**	**16,48±1,94**
GSH nmol/g tej.	**591,98±158,24**	**NS**	**758,27±114,96**
GSSG nmol/mg prot	**26,04±3,52**	**<0,001**	**15,96±1,23**
GSSG nmol/g tej.	**1082,71±75,23**	**<0,001**	**739,80±130,38**
GSH/GSSG	**0,55±0,15**	**<0,001**	**1,03±0,14**
GPx µmol/min/mg prot	**35,27±6,31**	**NS**	**36,91±4,38**
GPx µmol/min/g tej.	**1475,14±253,68**	**NS**	**1684,71±126,05**
GR µmol/min/mg prot	**11,11±1,76**	**NS**	**12,21±1,36**
GR µmol/min/g tej.	**467,71±93,69**	**NS**	**557,1429±24,59**
SOD U/mg prot	**9,74±3,21**	**NS**	**11,66±2,76**
SOD U/g tej.	**402,29±102,54**	**NS**	**533,43±120,15**
Proteínas mg prot/g tej.	**42,15±5,98**	**NS**	**46,13±5,87**

Tabla 16. Resultados de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo en epidermis con un tratamiento de 1,56 DEM. n = 7 en cada grupo.

GST: observamos una variación significativa de la actividad GST, tanto si lo expresamos por proteínas como si lo hacemos por tejido. Esta variación consistió en

un incremento del 82,2%, expresado por proteínas, y del 92% si lo referimos a tejido.

CAT: se halló un aumento significativo de la actividad catalasa, este aumento fue del 29,5% por mg de proteína, y del 41,31% por gramo de tejido.

TBARS: se observó un aumento significativo del contenido de TBARS del 46,4%, por mg de proteína, y del 61,3% por g de tejido.

GSH y GSSG: el contenido de glutatión reducido (GSH) no varió significativamente en función de la irradiación, a diferencia del glutatión oxidado (GSSG), que sufrió una disminución significativa de su concentración en función de la irradiación. Esta disminución fue del 38,7% por mg de proteína y del 31,6% per g de tejido. Como consecuencia de ello el cociente GSH/GSSG aumentó significativamente.

Otras enzimas: no hallamos variaciones significativas en las actividades enzimáticas de GPx, GR y SOD en este tratamiento.

Proteínas: no hubo variación significativa del contenido de proteínas en función de la irradiación.

2.4 Análisis y discusión de resultados

GST total

La actuación de la enzima GST se basa en asociar o conjugar los radicales libres con el glutatión (GSH), neutralitzándose así el efecto nocivo de estas especies tan reactivas.

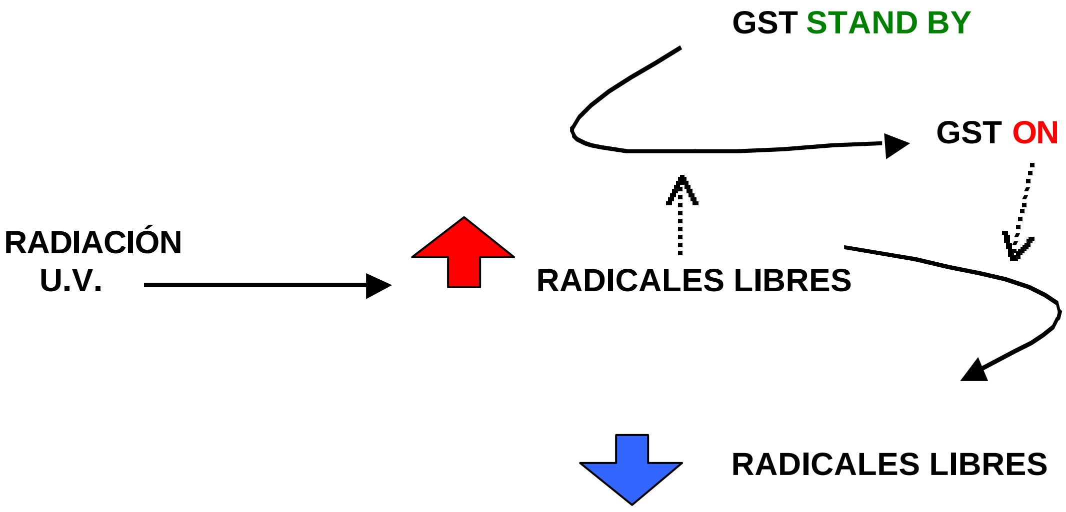


Figura 41. Inducción de la actividad de la enzima GST debido a los radicales libres.

Así pues, en los animales irradiados podríamos esperar obtener unos valores más elevados de la actividad GST que en el grupo control, ya que una mayor producción de RLO habría provocado una estimulación de su actividad detoxificadora. Pero, en el caso de la GST y de las otras enzimas se ha de tener en cuenta que los eritrocitos circulantes no pueden sintetizar nuevas moléculas de proteína, al ser células anucleadas, al contrario de lo que sucede en piel. Por lo tanto, en las experiencias obtenidas en tratamientos agudos de RUV, como es nuestro caso, los posibles incrementos de actividad enzimática en eritrocitos no serían debidos a un incremento de la síntesis, sino a cambios conformacionales, activaciones de la enzima o a inhibiciones de reguladores. En cambio, la síntesis de GSH sí que está conservada en los eritrocitos circulantes.

	CONTROL	1 DEM	1,25 DEM	1,56 DEM
GST total µmol/min/g Hb	640,14±88,55	939,57±117,32	991,66±64,38	660,28±111,07

Tabla 17. Media ± desviación estándar de la actividad GST en sangre para los diferentes tratamientos. n = 7 en todos los grupos.

CONTROL		**CONTROL**		**CONTROL**
<0,001		<0,001		NS
IRR.1,25 DEM	NS	**IRR. 1 DEM**	0,001	**IRR.1,56 DEM**
		<0,001		

Tabla 18. Actividad GST. Significación estadística de las diferencias observadas entre animales tratados y control, y entre los distintos modelos de tratamiento. Resultados de la tabla 17.

Obtuvimos un aumento significativo de la actividad GST en los grupos de tratamiento de 1 DEM y 1,25 DEM respecto al control en eritrocitos. Observamos que este aumento de la actividad enzimática no se manifestó en el caso del grupo irradiado con 1,56 DEM.

Además, observamos un descenso significativo de la actividad de esta enzima en el tratamiento 1,56 DEM respecto a los tratamientos de 1,25 y 1 DEM.

	CONTROL	1 DEM	1,25 DEM	1,56 DEM
GST nmol/min/mg prot	6,15±1,54	16,74±3,70	11,47±3,28	11,21±2,72
GST nmol/min/g tej.	263,9±93,22	679,10±183,34	459,52±125,10	506,88±96,09

Tabla 19. Media ± desviación estándar de la actividad GST en epidermis, expresado por miligramo de proteína y por gramo de tejido, para todos los diferentes tratamientos. n = 7 en todos los grupos.

CONTROL		**CONTROL**		**CONTROL**
0,022		<0,001		0,032
IRR.1,25 DEM	0,024	**IRR. 1 DEM**	0,017	**IRR.1,56 DEM**
		NS		

Tabla 20. Actividad GST por miligramo de proteína. Significación estadística de las diferencias observadas entre animales tratados y control, y entre los distintos modelos de tratamiento. Resultados de la tabla 19.

CONTROL		**CONTROL**		**CONTROL**
NS		<0,001		0,018
IRR.1,25 DEM	0,036	**IRR. 1 DEM**	NS	**IRR.1,56 DEM**
		NS		

Tabla 21. Actividad GST por gramo de tejido. Significación estadística de las diferencias observadas entre animales tratados y control, y entre los distintos modelos de tratamiento. Resultados de la tabla 19.

En epidermis, este incremento también se produjo en todos los diferentes tratamientos. El incremento de actividad observado en los grupos irradiados fue más elevado si lo comparamos con los resultados obtenidos en eritrocitos, sugiriendo que hay un efecto más evidente o aparente en el tejido diana y un reflejo un poco más débil de este efecto en sangre (este comportamiento también se observó en otros parámetros).

Tanto en eritrocitos como en epidermis, hallamos el valor más elevado de actividad de la enzima GST en el grupo de tratamiento correspondiente a 1 DEM.

GST termoestable (52º C)

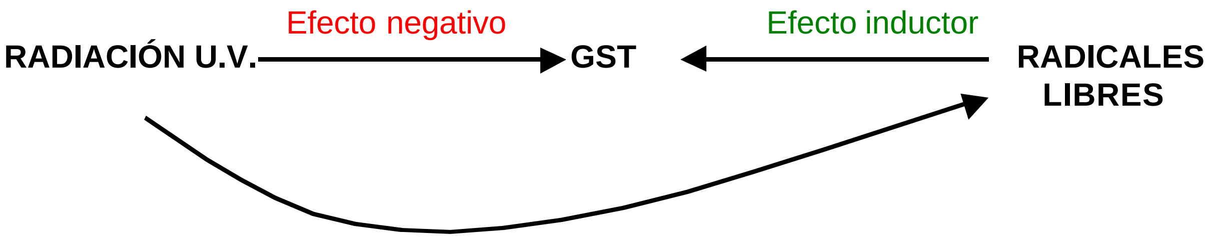
Parámetro que nos muestra la termoestabilidad de la enzima, es decir, es un reflejo del buen estado o calidad de la enzima. Cuanta mayor sea la proporción de la enzima termoestable, mayor será la calidad del enzima. Esta característica sólo ha sido descrita en eritrocitos, no en piel (Ortín et al, 1996).

Así pues, podremos observar el efecto de la radiación sobre la estabilidad enzimática de la GST.

Esperaríamos que:



Independientemente de que un incremento de los RLO induzca la síntesis de nuevas moléculas de GST, el efecto directo de la RUV y de los RLO sobre las moléculas ya presentes de GST puede producir una alteración de su "calidad". Por lo tanto, a medida que fuésemos aumentando la intensidad de la irradiación podríamos detectar una disminución de la termoestabilidad enzimática de la GST en eritrocitos. Pero, ¿cómo es, pues, que la termoestabilidad de los grupos irradiados no fue más baja que en el control? De hecho, la única diferencia significativa la hallamos en el grupo irradiado con 1 DEM, donde la proporción de GST termoestable fue superior a la del control. En este caso hemos de concluir que la RUV induce algún tipo de cambio que activa la conformación de la enzima hacia una forma de mayor termoestabilidad.



	CONTROL	1 DEM	1,25 DEM	1,56 DEM
GST 52º µmol/min/g Hb	43,8±11,55	95,28±18,17	65,46±8,48	56,78±15,87

Tabla 22 . Media ± desviación estándar de la actividad GST termoestable en eritrocito para todos los tratamientos. n = 7 en todos los grupos.

CONTROL		**CONTROL**		**CONTROL**
NS		<0,001		NS
IRR.1,25 DEM	0,010	**IRR. 1 DEM**	0,001	**IRR.1,56 DEM**
		NS		

Tabla 23. Actividad GST termoestable. Significación estadística de las diferencias observadas entre animales tratados y control, y entre los distintos modelos de tratamiento. Resultados de la tabla 22.

De todas formas, se observó una tendencia a la afectación global de la GST eritrocitaria a medida que se incrementa la dosis de RUV. Así, vemos que para el tratamiento más elevado de (1,56 DEM) hubo una disminución de la actividad total de la GST respecto a los dos tratamientos anteriores (1, 1,25 DEM). En cuanto a la actividad termoestable, ésta aumentó, en relación al control, tras la irradiación a 1 DEM, disminuyendo proporcionalmente tras las irradiaciones a 1,25 y 1,56 DEM.

GSH y GSSG

El glutatión reducido (GSH) es una molécula antioxidante en sí misma. Su concentración nos indica la reserva de este componente y refleja su grado de utilización. Así pues, esperaríamos que tras una mayor irradiación se produjese un mayor consumo de esta molécula, ya que a ella se asociarían muchos de los compuestos nocivos generados por la radiación ultravioleta, neutralizándose así su efecto negativo.

Así pues, a medida que fuese aumentando la intensidad de la irradiación, podríamos esperar que los niveles de reserva de este compuesto fueran más bajos.

El glutatión oxidado (GSSG) es un reflejo del consumo de glutatión reducido por parte de la GPx, de forma que cuanta mayor actividad enzimática GPx, mayor contenido de glutatión oxidado esperaríamos hallar.

	CONTROL	1 DEM	1,25 DEM	1,56 DEM
GSH eritrocito µmol/g Hb	5,25±0,44	3,91±0,70	4,74±0,33	4,73±0,49
GSSG eritrocito µmol/g Hb	1,19±0,15	0,79±0,13	0,48±0,086	0,90±0,16
GSH plasma nmol/ml	20,41±2,19	11,59±3,08	17,17±4,62	23,70±2,79
GSSG plasma nmol/ml	42,90±5,47	35,68±5,33	46,78±8,67	35,95±3,09

Tabla 24. Media ± desviación estándar de los nivells de GSH y GSSG en eritrocitos y plasma para los diferentes tratamientos. n = 7 en todos los grupos.

CONTROL		**CONTROL**		**CONTROL**
NS		0,001		NS
IRR.1,25 DEM	0,049	**IRR. 1 DEM**	NS	**IRR.1,56 DEM**
		NS		

Tabla 25. GSH eritrocitario. Significación estadística de las diferencias observadas entre animales tratados y control, y entre los distintos modelos de tratamiento. Resultados de la tabla 24.

CONTROL		**CONTROL**		**CONTROL**
<0,001		<0,001		0,007
IRR.1,25 DEM	0,003	**IRR. 1 DEM**	NS	**IRR.1,56 DEM**
		<0,001		

Tabla 26. GSSG eritrocitario. Significación estadística de las diferencias observadas entre animales tratados y control, y entre los distintos modelos de tratamiento. Resultados de la tabla 24.

CONTROL		**CONTROL**		**CONTROL**
NS		<0,001		NS
IRR.1,25 DEM	0,042	**IRR. 1 DEM**	<0,001	**IRR.1,56 DEM**
		0,014		

Tabla 27. GSH en plasma. Significación estadística de las diferencias observadas entre animales tratados y control, y entre los distintos modelos de tratamiento. Resultados de la tabla 24.

CONTROL		**CONTROL**		**CONTROL**
NS		NS		NS
IRR.1,25 DEM	NS	**IRR. 1 DEM**	NS	**IRR.1,56 DEM**
		NS		

Tabla 28. GSSG en plasma. Significación estadística de las diferencias observadas entre animales tratados y control, y entre los distintos modelos de tratamiento. Resultados de la tabla 24.

Se observó, efectivamente, una disminución de la concentración de GSH en los grupos irradiados respecto al control. A pesar de ello, las diferencias en el caso del glutatión eritrocitario y plasmático sólo fueron significativas respecto al grupo tratado con 1 DEM.

Por otro lado, observamos una disminución significativa respecto al control en el contenido de glutatión oxidado en los tres tratamientos, aunque, como veremos posteriormente, la actividad de la enzima GPx aumentó significativamente respecto al control.

¿A qué podría ser debida la no-disminución significativa del glutatión en el caso de 1,25 y 1,56 DEM?

¿Cómo se puede explicar que no aumentasen los niveles de GSSG en los animales irradiados?

Antes de abordar estas cuestiones, tenemos que recordar el papel del glutatión como componente principal en la maquinaria antirradicalar:

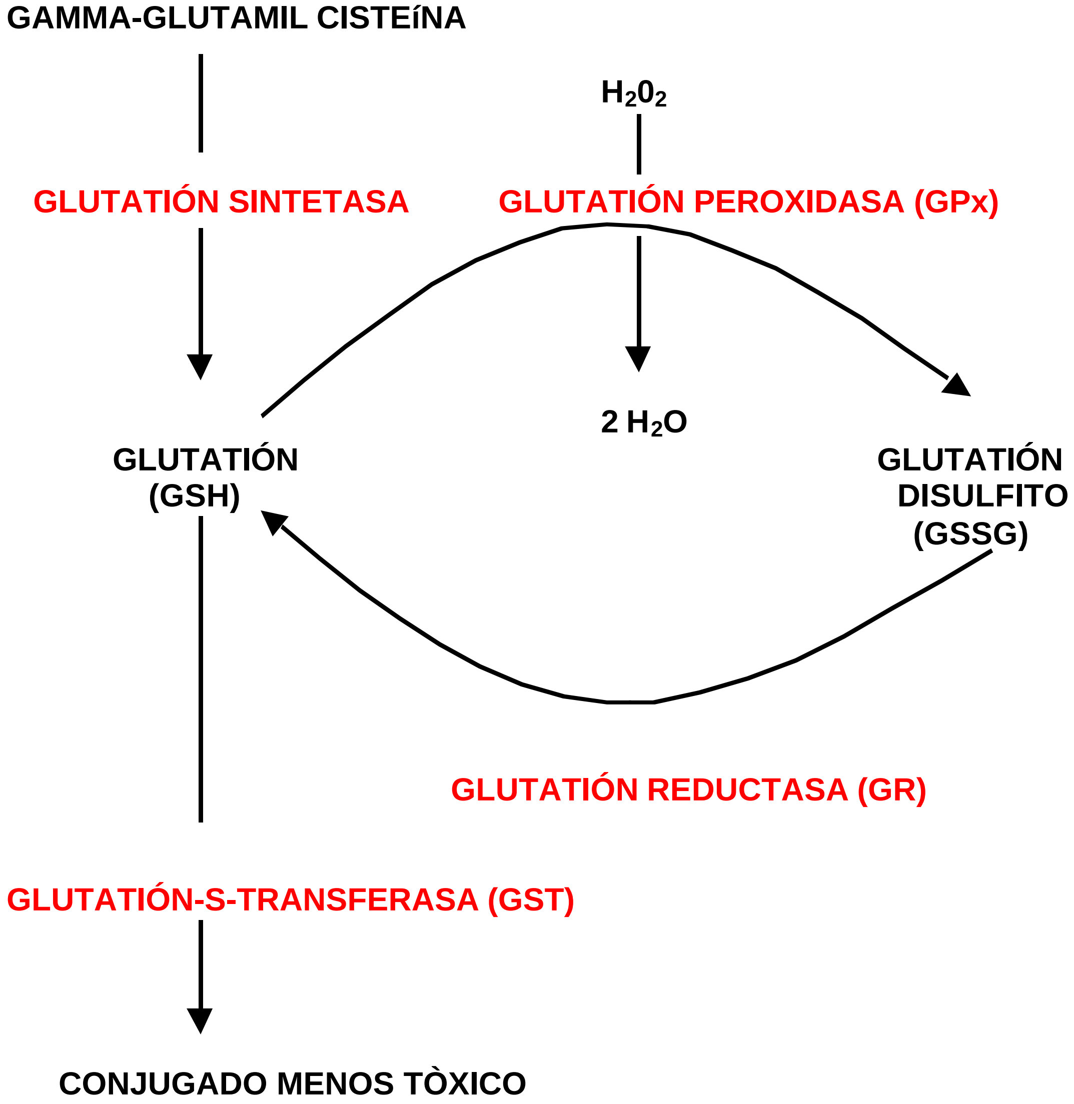


Figura 42. Papel del glutatión en el mecanismo de defensa antirradicalar.

Podemos observar cómo no sólo la GST consume el glutatión sino que éste también es utilizado por la GPx.

Observamos que los niveles de actividad de la GPx fueron significativamente diferentes del control, observándose un aumento de su actividad en los tres tratamientos. A pesar de ello, el incremento de actividad enzimática de la GPx no fue significativamente diferente entre las tres pautas de irradiación; por lo tanto, las posibles modificaciones que se produzcan en las concentraciones de glutatión deberán (o deberían) ser homogéneas o iguales para los tres tratamientos.

Como respuesta a las cuestiones anteriores, podríamos pensar que esta diferencia no significativa en los tratamientos de 1,25 y 1,56 DEM respecto al consumo de

glutatión podría ir ligada a la disminución de la actividad GST total y de la termoestabilidad (GST termoestable) de la enzima GST, lo que implicaría un menor consumo de este componente. Además, es justamente en el tratamiento de 1,56 DEM en el que se observó un aumento significativo respecto al nivel anterior en el contenido de GSSG.

Podríamos pensar pues, que lo que sucede inicialmente es que está potenciada la actividad de la enzima GST, que implica el consumo masivo de glutatión por parte de esta enzima, “secuestrándolo” e impidiendo su utilización por parte de la GPx.

Posteriormente, a medida que aumenta la intensidad de la irradiación, se empieza a producir la transición respecto al consumo de glutatión, ya que éste pasa de ser utilizado per la enzima GST (más frágil y afectada ya por los efectos de la irradiación) a ser utilizado por la GPx, empezándose a observar entonces el correspondiente aumento en el contenido de GSSG.

En epidermis este fenómeno sería también evidente, observándose un patrón de acción paralelo al de los eritrocitos.

	CONTROL	**1 DEM**	**1,25 DEM**	**1,56 DEM**
GSH nmol/ mg prot	13,98±2,66	5,44±1,52	8,26±2,51	16,48±1,94
GSSG nmol/ mg prot	26,04±3,52	14,48±1,78	15,75±2,19	15,96±1,23
GSH nmol/g tej.	591,98±158,24	217,81±57,14	334,42±111,39	758,27±114,96
GSSG nmol/g tej.	1082,71±75,23	583,4±76,92	636,27±111,23	739,80±130,38

Tabla 29. Media ± desviación estándar de las concentraciones de GSH y GSSG en epidermis, expresadas por miligramo de proteína y por gramo de tejido, para todos los tratamientos. n = 7 en todos los grupos.

CONTROL		CONTROL		CONTROL
0,001		<0,001		NS
IRR.1,25 DEM	NS	IRR. 1 DEM	<0,001	IRR.1,56 DEM
		<0,001		

Tabla 30. GSH en epidermis por miligramo de proteína. Significación estadística de las diferencias observadas entre animales tratados y control, y entre los distintos modelos de tratamiento. Resultados de la tabla 29.

CONTROL		CONTROL		CONTROL
<0,001		<0,001		<0,001
IRR.1,25 DEM	NS	IRR. 1 DEM	NS	IRR.1,56 DEM
		NS		

Tabla 31. GSSG en epidermis por miligramo de proteína. Significación estadística de las diferencias observadas entre animales tratados y control, y entre los distintos modelos de tratamiento. Resultados de la tabla 29.

CONTROL		CONTROL		CONTROL
0,004		<0,001		NS
IRR.1,25 DEM	NS	IRR. 1 DEM	<0,001	IRR.1,56 DEM
		<0,001		

Tabla 32. GSH en epidermis por gramo de tejido. Significación estadística de las diferencias observadas entre animales tratados y control, y entre los distintos modelos de tratamiento. Resultados de la tabla 29.

CONTROL		CONTROL		CONTROL
<0,001		<0,001		<0,001
IRR.1,25 DEM	NS	IRR. 1 DEM	NS	IRR.1,56 DEM
		NS		

Tabla 33. GSSG en epidermis por gramo de tejido. Significación estadística de las diferencias observadas entre animales tratados y control, y entre los distintos modelos de tratamiento. Resultados de la tabla 29.

TBARS

El contenido de TBARS es un reflejo del nivel de lipoperoxidación, que podemos relacionar con el ataque de los radicales libres sobre las membranas celulares

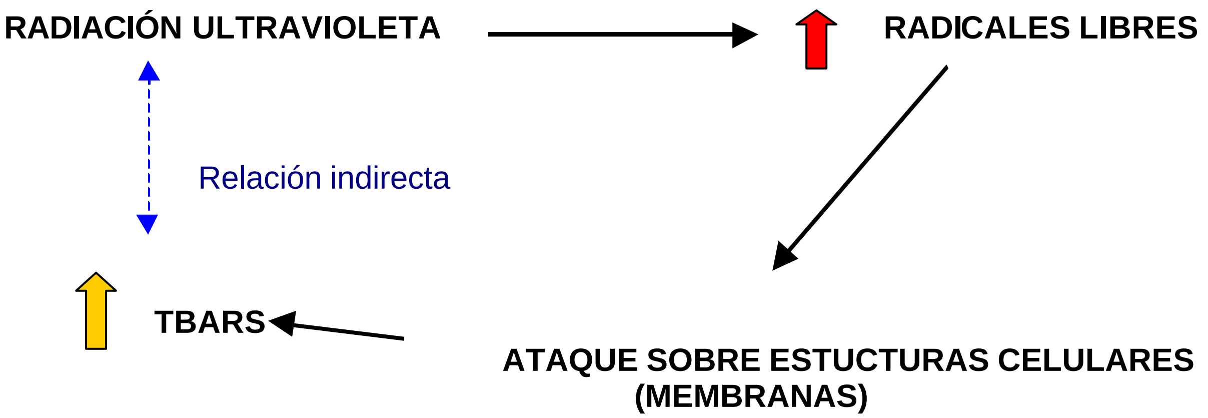


Figura 43. Esquema del mecanismo de producción de los TBARS.

En eritrocitos y plasma:

	CONTROL	1 DEM	1,25 DEM	1,56 DEM
TBARS eritrocito nmol/g Hb	3,92±1,20	3,71±0,74	3,59±0,55	5,43±1,47
TBARS plasma nmol/ml	2,31±0,50	2,06±0,24	2,43±0,29	3,59±0,40

Tabla 34. Media ± desviación estándar de los niveles de TBARS en eritrocitos y plasma para todos los diferentes tratamientos. n = 7 en todos los grupos.

CONTROL		**CONTROL**		**CONTROL**
NS		NS		NS
IRR.1,25 DEM	NS	**IRR. 1 DEM**	0,047	**IRR.1,56 DEM**
		0,031		

Tabla 35. TBARS en eritrocito. Significación estadística de las diferencias observadas entre animales tratados y control, y entre los distintos modelos de tratamiento. Resultados de la tabla 34.

CONTROL		**CONTROL**		**CONTROL**
NS		NS		<0,001
IRR.1,25 DEM	NS	**IRR. 1 DEM**	<0,001	**IRR.1,56 DEM**
		<0,001		

Tabla 36. TBARS en plasma. Significación estadística de las diferencias observadas entre animales tratados y control, y entre los distintos modelos de tratamiento. Resultados de la tabla 34.

Observamos que en los niveles de irradiación de 1 y 1,25 DEM no hubo variación ni en eritrocitos ni en plasma, pero en el nivel más elevado de irradiación (1,56 DEM) hubo un aumento en el contenido de este producto de lipoperoxidación en los dos compartimentos (plasma y eritrocito).

Este hecho se puede interpretar como que en este nivel de tratamiento las estructuras celulares ya empiezan a sufrir de una forma importante los efectos de la RUV.

En epidermis:

	CONTROL	**1 DEM**	**1,25 DEM**	**1,56 DEM**
TBARS Nmol TBARS/mg prot	81,38±13,21	66,21±9,57	75,37±19,86	119,18±10,95
TBARS Nmol TBARS/g tej.	3,39±0,51	2,68±0,52	3±0,65	5,47±0,67

Tabla 37. Media ± desviación estándar del contenido de TBARS en epidermis expresado por miligramo de proteína y por gramo de tejido para todos los tratamientos. n = 7 en todos los grupos.

CONTROL		**CONTROL**		**CONTROL**
NS		NS		<0,001
IRR.1,25 DEM	NS	**IRR. 1 DEM**	<0,001	**IRR.1,56 DEM**
		<0,001		

Tabla 38. TBARS en epidermis por miligramo de proteína. Significación estadística de las diferencias observadas entre animales tratados y control, y entre los distintos modelos de tratamiento. Resultados de la tabla 37.

CONTROL		**CONTROL**		**CONTROL**
NS		NS		<0,001
IRR.1,25 DEM	NS	**IRR. 1 DEM**	<0,001	**IRR.1,56 DEM**
		<0,001		

Tabla 39. TBARS en epidermis por gramo de tejido. Significación estadística de las diferencias observadas entre animales tratados y control, y entre los distintos modelos de tratamiento. Resultados de la tabla 37.

El comportamiento en epidermis fue similar a lo observado en sangre, y es que sólo se produjo un aumento significativo en el último nivel de tratamiento.

Esto nos está indicando que para este nivel de irradiación ya se produce un daño importante en estructuras celulares como las membranas.

Respecto a la técnica fluorimétrica utilizada para detectar los TBARS, hemos de comentar que es más sensible y específica que la técnica original espectrofotométrica; por otro lado, no detectamos sólo malondialdehido, que es uno de los tipos de TBARS, sino que detectamos inespecíficamente todos los TBARS, lo que nos permite valorar de una forma más completa los efectos de la RUV.

CATALASA

La función de esta enzima es detoxificar o eliminar el peróxido de hidrógeno generado. A diferencia de la GPx, no consume GSH.

Frente a un incremento de radicales hidroxilo, cabría esperar un incremento de su actividad como respuesta al estrés oxidativo generado.

En eritrocito:

	CONTROL	**1 DEM**	**1,25 DEM**	**1,56 DEM**
CAT mmol/min/g Hb	108,23±9,00	108,34±15,46	125,68±11,29	134,13±7,02

Tabla 40. Media ± desviación estándar de la actividad CAT en sangre, para todos los tratamientos. n = 7 en todos los grupos.

CONTROL		**CONTROL**		**CONTROL**
NS		NS		<0,001
IRR.1,25 DEM	NS	**IRR. 1 DEM**	0,003	**IRR.1,56 DEM**
		NS		

Tabla 41. Actividad CAT en sangre. Significación estadística de las diferencias observadas entre animales tratados y control, y entre los distintos modelos de tratamiento. Resultados de la tabla 40.

En epidermis:

	CONTROL	**1 DEM**	**1,25 DEM**	**1,56 DEM**
CAT µmol/min/mg prot	50,72±7,96	65,11±9,16	77,52±8,65	65,72±5,55
CAT µmol/min/g tej.	2,13±0,42	2,61±0,29	3,11±0,27	3,01±0,28

Tabla 42. Media ± desviación estándar de la actividad CAT en epidermis expresada por miligramo de proteína y por gramo de tejido para todos los diferentes tratamientos. n = 7 en todos los grupos.

CONTROL		**CONTROL**		**CONTROL**
<0,001		0,023		0,017
IRR.1,25 DEM	NS	**IRR. 1 DEM**	NS	**IRR.1,56 DEM**
		NS		

Tabla 43. Actividad CAT en epidermis por miligramo de proteína. Significación estadística de las diferencias observadas entre animales tratados y control, y entre los distintos modelos de tratamiento. Resultados de la tabla 42.

CONTROL		**CONTROL**		**CONTROL**
<0,001		NS		0,001
IRR.1,25 DEM	NS	**IRR. 1 DEM**	NS	**IRR.1,56 DEM**
		NS		

Tabla 44. Actividad CAT en epidermis por gramo de tejido. Significación estadística de las diferencias observadas entre animales tratados y control, y entre los distintos modelos de tratamiento. Resultados de la tabla 42.

Observamos que en eritrocito hubo un aumento progresivo de la actividad CAT en función de la irradiación, que se hizo significativo en el nivel de tratamiento 1,56 DEM. En epidermis este aumento ya fue significativo en los primeros niveles de tratamiento. Por lo tanto, dentro de los límites de intensidad UV utilizados, podemos concluir que hay una inducción en la actividad de la enzima. Esta inducción se podría explicar por un aumento de su síntesis en epidermis. En sangre, al no poderse sintetizar la enzima en los eritrocitos circulantes, el incremento de la actividad sería secundario a algún tipo de cambio en la conformación de la enzima o a la inhibición de algún factor represor.

GPx

La actividad de esta enzima, como ya hemos visto en la figura 42, permite la detoxificación de los compuestos nocivos derivados del estrés oxidativo, mediante la oxidación del GSH y generando GSSG.

En eritrocito:

	CONTROL	**1 DEM**	**1,25 DEM**	**1,56 DEM**
GPx mmol/min/g Hb	12,33±1255,87	20,86±3035	23,73±2819,54	21,95±3356,09

Tabla 45. Media ± desviación estándar de la actividad de la GPx en sangre, para todos los tratamientos. n = 7 en todos los grupos.

CONTROL		**CONTROL**		**CONTROL**
<0,001		<0,001		<0,001
IRR.1,25 DEM	NS	**IRR. 1 DEM**	NS	**IRR.1,56 DEM**
		NS		

Tabla 46. Actividad GPx en sangre. Significación estadística de las diferencias observadas entre animales tratados y control, y entre los distintos modelos de tratamiento. Resultados de la tabla 45.

Observamos un aumento significativo de la enzima respecto al control en los tres niveles de tratamiento. De la misma forma que hemos comentado para las otras

enzimas, el incremento de la actividad de esta enzima sólo se puede explicar por algún mecanismo diferente al aumento de su síntesis: activación de algún cofactor, inhibición de represores, etc.

En epidermis:

	CONTROL	1 DEM	1,25 DEM	1,56 DEM
GPx µmol/min/mg prot	35,27±6,31	35,05±4,07	29,88±3,93	36,91±4,38
GPx µmol/min/g tej.	1475,14±253,68	1410,43±160,21	1201,29±155,33	1684,71±126,05

Tabla 47. Media ± desviación estándar de la actividad GPx en epidermis expresada por miligramo de proteína y por gramo de tejido para todos los tratamientos. n = 7 en todos los grupos.

CONTROL		CONTROL		CONTROL
NS		NS		NS
IRR.1,25 DEM	NS	IRR. 1 DEM	NS	IRR.1,56 DEM
		NS		

Tabla 48. Actividad GPx en epidermis por miligramo de proteína. Significación estadística de las diferencias observadas entre animales tratados y control, y entre los distintos modelos de tratamiento. Resultados de la tabla 47.

CONTROL		CONTROL		CONTROL
NS		NS		NS
IRR.1,25 DEM	NS	IRR. 1 DEM	NS	IRR.1,56 DEM
		0,001		

Tabla 49. Actividad GPx en epidermis por gramo de tejido. Significación estadística de las diferencias observadas entre animales tratados y control, y entre los distintos modelos de tratamiento. Resultados de la tabla 47.

En epidermis, a diferencia de lo que sucede en eritrocito no hallamos diferencias significativas entre los animales irradiados y controles. Esta discrepancia se podría explicar por el hecho que los RLO generados por la RUV son neutralizados por otros sistemas protectores (como la GST y la CAT), de tal forma que la cantidad de peróxidos sin neutralizar sería pequeña y, por tanto, no sería necesario la

intervención de la GPx. Esta explicación se vería reforzada por el hecho que la cantidad de TBARS en epidermis sólo aumentó significativamente en el caso de los animales irradiados con la dosis más alta de RUV.

GR

	CONTROL	1 DEM	1,25 DEM	1,56 DEM
GR µmol/min/g Hb	218,63±66,27	145,29±22,59	183,02±43,89	223,94±56,99

Tabla 50. Media ± desviación estándar de la actividad de la enzima GR en sangre, para todos los tratamientos. n = 7 en todos los grupos.

CONTROL		**CONTROL**		**CONTROL**
NS		NS		NS
IRR.1,25 DEM	NS	**IRR. 1 DEM**	NS	**IRR.1,56 DEM**
		NS		

Tabla 51. Actividad GR en sangre. Significación estadística de las diferencias observadas entre animales tratados y control, y entre los distintos modelos de tratamiento. Resultados de la tabla 50.

	CONTROL	1 DEM	1,25 DEM	1,56 DEM
GR µmol/min/mg prot	11,11±1,76	13,71±1,61	13,11±2,18	12,21±1,36
GR µmol/min/g tej.	467,71±93,69	550,71±48,07	526±75,75	557,1429±24,59

Tabla 52. Media ± desviación estándar de la actividad GR en epidermis expresada por miligramo de proteína y por gramo de tejido para todos los tratamientos. n = 7 en todos los grupos.

CONTROL		**CONTROL**		**CONTROL**
NS		NS		NS
IRR.1,25 DEM	NS	**IRR. 1 DEM**	NS	**IRR.1,56 DEM**
		NS		

Tabla 53. Actividad GR en epidermis por miligramo de proteína. Significación estadística de las diferencias observadas entre animales tratados y control, y entre los distintos modelos de tratamiento. Resultados de la tabla 52.

CONTROL		**CONTROL**		**CONTROL**
NS		NS		NS
IRR.1,25 DEM	NS	**IRR. 1 DEM**	NS	**IRR.1,56 DEM**
		NS		

Tabla 54. Actividad GR en epidermis por gramo de tejido. Significación estadística de las diferencias observadas entre animales tratados y control, y entre los distintos modelos de tratamiento. Resultados de la tabla 52.

La GR es la enzima que reduce las moléculas de GSSG. Si no hay un incremento significativo de la forma GSSG, puede ser que la actividad GR no se modifique. En nuestros resultados, las pequeñas variaciones de los valores de actividad GR no fueron significativos, ni en eritrocitos ni en epidermis. Este hecho se correlaciona con los resultados hallados de GSH y GSSG. Si la mayor parte del GSH se consume por la acción de la GST, tal como hemos sugerido anteriormente, no habría un incremento suficiente de las concentraciones de GSSG para activar la GR.

SOD

Esta enzima se encarga de la eliminación o detoxificación de un compuesto muy reactivo como es el anión superóxido.

	CONTROL	**1 DEM**	**1,25 DEM**	**1,56 DEM**
SOD U/g Hb	2756,86±922,27	2445,71±451,89	3130,57±251,04	3143,86±205,33

Tabla 55. Media ± desviación estándar de la actividad de la enzima SOD en sangre, para todos los tratamientos. n = 7 en todos los grupos.

CONTROL		**CONTROL**		**CONTROL**
NS		NS		NS
IRR.1,25 DEM	NS	**IRR. 1 DEM**	NS	**IRR.1,56 DEM**
		NS		

Tabla 56. Actividad SOD en sangre. Significación estadística de las diferencias observadas entre animales tratados y control, y entre los distintos modelos de tratamiento. Resultados de la tabla 55.

No se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos respecto la actividad de esta enzima en sangre.

En epidermis:

	CONTROL	1 DEM	1,25 DEM	1,56 DEM
SOD U/mg prot	9,74±3,21	13,31±4,73	10,34±1,68	11,66±2,76
SOD U/g tej.	402,29±102,54	529,43±161,80	413,57±49,70	533,43±120,15

Tabla 57. Media ± desviación estándar de la actividad SOD en epidermis expresado por miligramo de proteína y por gramo de tejido para todos los tratamientos. n = 7 en todos los grupos.

CONTROL		**CONTROL**		**CONTROL**
NS		NS		NS
IRR.1,25 DEM	NS	**IRR. 1 DEM**	NS	**IRR.1,56 DEM**
		NS		

Tabla 58. Actividad SOD epidermis por miligramo de proteína. Significación estadística de las diferencias observadas entre animales tratados y control, y entre los distintos modelos de tratamiento. Resultados de la tabla 57.

CONTROL		**CONTROL**		**CONTROL**
NS		NS		NS
IRR.1,25 DEM	NS	**IRR. 1 DEM**	NS	**IRR.1,56 DEM**
		NS		

Tabla 59. Actividad SOD en epidermis por gramo de tejido. Significación estadística de las diferencias observadas entre animales tratados y control, y entre los distintos modelos de tratamiento. Resultados de la tabla 57.

No se observaron tampoco diferencias significativas en la actividad de la enzima SOD entre los diferentes tratamientos en epidermis.

El hecho de no haber observado cambios significativos en la actividad SOD nos lleva a pensar que no hay un incremento importante de producción de radicales superóxido, sobre los cuales actúa la SOD. Las especies reactivas de oxígeno,

capaces de generar radicales superóxido, se forman después de la RUV, al igual que otras formas reactivas del oxígeno. Ahora bien, en nuestro caso es posible que estas formas reactivas sean mayoritariamente neutralizadas por la GST, la CAT y directamente por el GSH; en este caso, no habría modificaciones importantes de la SOD. También hemos de recordar que los TBARS aumentan únicamente después de la dosis de RUV más elevada; y los TBARS proceden, en parte, del peróxido de hidrógeno derivado del efecto neutralizador de la SOD.

Si nos fijamos en la evolución de los valores de la SOD en función de la intensidad de la RUV, vemos que en eritrocitos el valor más elevado se obtiene a la dosis más elevada de RUV, igual que sucedía con los TBARS. Por lo tanto, es posible que utilizando dosis más altas de RUV, una vez agotados los otros sistemas de protección, también se haya afectado la SOD.

2.5 Correlaciones y regresiones

Con el modelo experimental utilizado para determinar la afectación de los parámetros derivados de la generación de RLO se llevó también a cabo el recuento de células de Langerhans por la técnica de la ATPAasa.

Los resultados fueron los siguientes:

	CONTROL	1 DEM	1,25 DEM	1,56 DEM
Células Langerhans/mm^2	563 ± 26	433 ± 39	399 ± 43	435 ± 41

Tabla 60. Media ± desviación estándar del número de células de Langerhans para todos los tratamientos. n = 7 en todos los grupos.

CONTROL		**CONTROL**		**CONTROL**
<0,001		<0,001		<0,001
IRR.1,25 DEM	NS	**IRR. 1 DEM**	NS	**IRR.1,56 DEM**
		NS		

Tabla 61. Células de Langerhans. Significación estadística de las diferencias observadas entre animales tratados y control, y entre los distintos modelos de tratamiento. Resultados de la tabla 60.

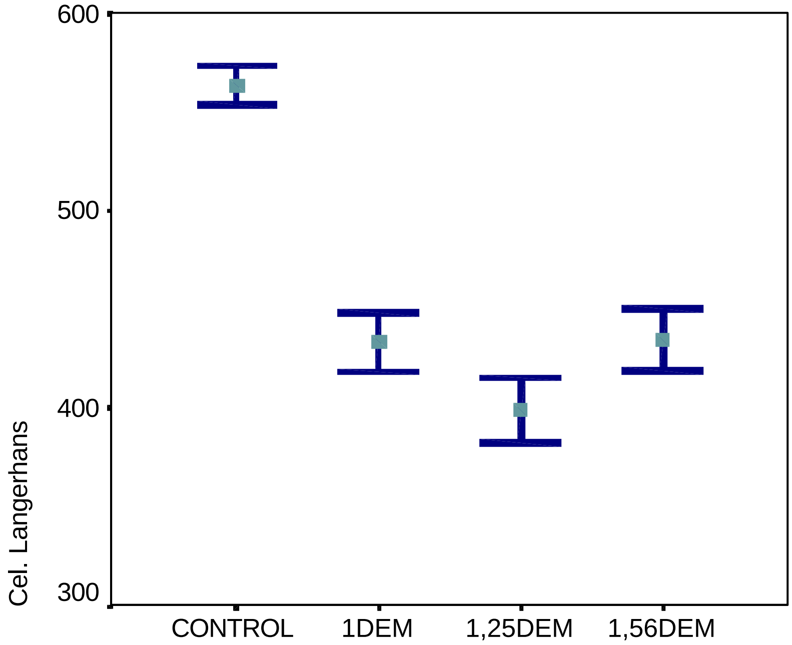


Figura 44. Representación gráfica del número de células de Langerhans en función del tratamiento. Resultados de la tabla 60.

Para hallar las relaciones a nivel sistémico entre los procesos inmunitarios (que vienen determinados por las células de Langerhans) y los radicales libres derivados de la radiación ultravioleta, se realizaron dos pruebas estadísticas: las correlaciones de Pearson, que nos mostrarán las relaciones entre el parámetro "células de Langerhans" con los parámetros estudiados de estrés oxidativo, y las regresiones lineales múltiples que nos indicarán las variables predictoras.

2.5.1. Correlaciones de Pearson

Mediante este test estadístico observamos la relación que mantienen los diferentes parámetros estudiados generados como consecuencia de la radiación ultravioleta, con el número de células de Langerhans, en función de la irradiación. Para así poder observar patrones en el "comportamiento" de los valores de estrés oxidativo analizado y el número de estas células.

En la siguiente tabla hemos resumido todas las correlaciones que han sido significativas.

Eritrocitos	**GST total**	**GST 52º**	**GSH**	**GSSG**	**GSH/GSSG**	**CAT**	**GPx**
Células Langerhans	r=-0,497 *p*=0,008	r=-0,396 *p*=0,041	r=0,406 *p*=0,032	r=0,638 *p*<0,001	r=-0,380 *p*=0,046	r=-0,460 *p*=0,014	r=-0,837 *p*<0,001
Epidermis	**GST** mg prot	**GST** g tej.	**CAT** mg prot	**CAT** g tej.	**GSSG** mg prot	**GSSG** g tej.	
Células Langerhans	r=-0,541 *p*=0,003	r=-0,507 *p*=0,006	r=-0,703 *p*<0,001	r=-0,651 *p*<0,001	r=0,749 *p*<0,001	r=0,779 *p*<0,001	

Tabla 62. Correlaciones de Pearson entre las CL y los diferentes parámetros relacionados con los RLO en eritrocitos (parte superior) y epidermis (parte inferior). r= valor de la r de Pearson; *p*= significación estadística.

En primer lugar se muestra la correlación entre las células de Langerhans y la actividad de la enzima GST (figura 45).

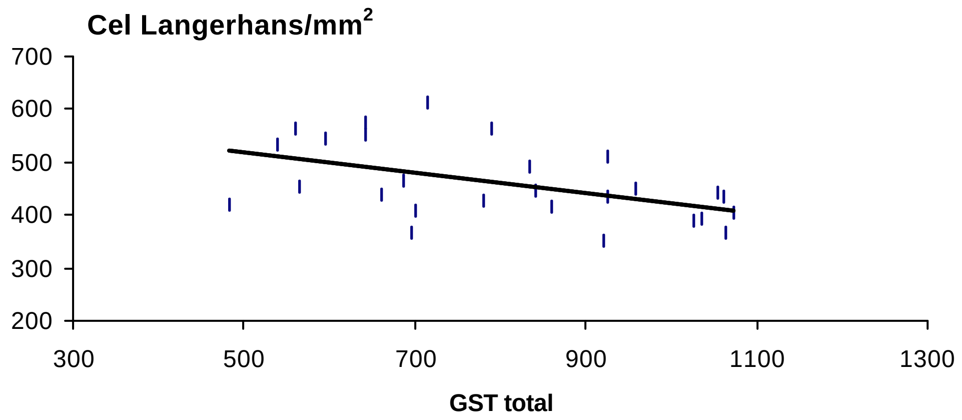


Figura 45. Correlación negativa entre la actividad GST y el número de células de Langerhans.

La correlación obtenida podría venir expresada por la siguiente fórmula: *células de Langerhans =-0,1918 GST total + 615,02.*

De forma que un menor número de células de Langerhans va asociado a una mayor actividad de la enzima GST.

La correlación entre el número de células de Langerhans y la actividad GST termoestable se muestra en la figura 46

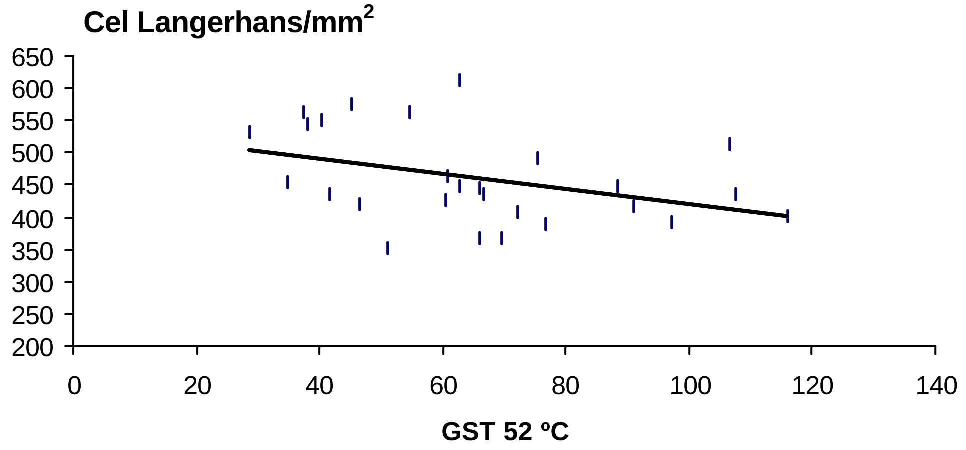


Figura 46. Correlación negativa entre el número de células de Langerhans y la actividad termoestable de la GST.

La correlación entre los dos parámetros podría venir expresada por la siguiente fórmula: *células de Langerhans = -1,1838 GST 52 ºC + 539,36.*

El contenido de glutatión reducido presentó una correlación positiva respecto al número de células de Langerhans, como podemos observar en la figura 47.

De forma que la disminución en el número de células de Langerhans se ve acompañada por un menor contenido de GSH eritrocitario.

La correlación se podría expresar por la siguiente fórmula: *células de Langerhans = 43,194 GSH eritrocito + 256,2*

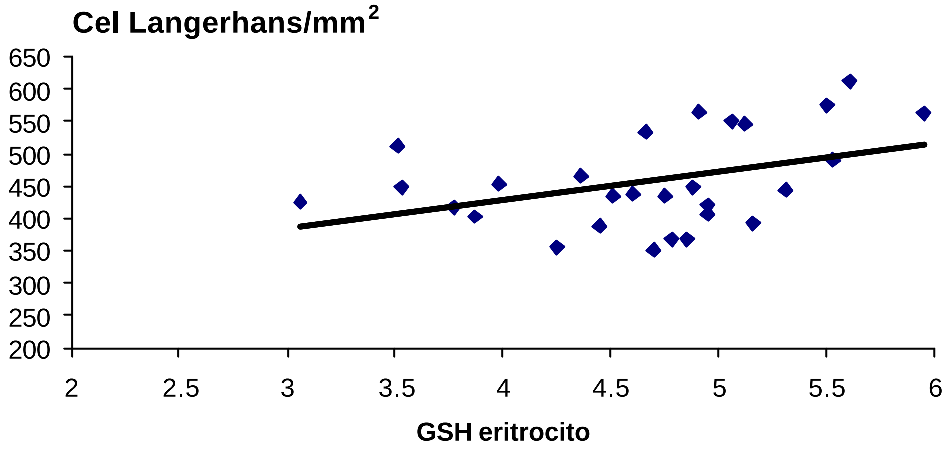


Figura 47. Correlación positiva entre el número de células de Langerhans y el contenido de glutatión reducido eritrocitario.

La correlación entre el número de células de Langerhans y el contenido de glutatión oxidado (GSSG) se muestra en la figura 48.

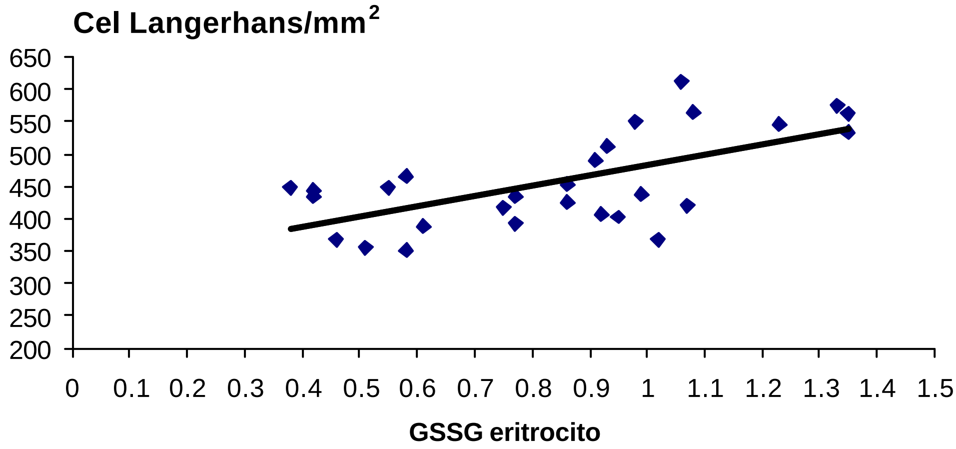


Figura 48. Correlación positiva entre el número de células de Langerhans y el contenido de glutatión oxidado eritrocitario.

Podríamos expresar esta relación mediante la siguiente fórmula: *células de Langerhans = 160,44GSSG + 321,87.*

De forma que una disminución en el número de células de Langerhans se ve acompañada por unos bajos niveles respecto al contenido de GSSG en eritrocito.

La correlación entre el cociente GSH/GSSG eritrocitario y el número de células de Langerhans viene determinada por el gráfico mostrado en la figura 49.

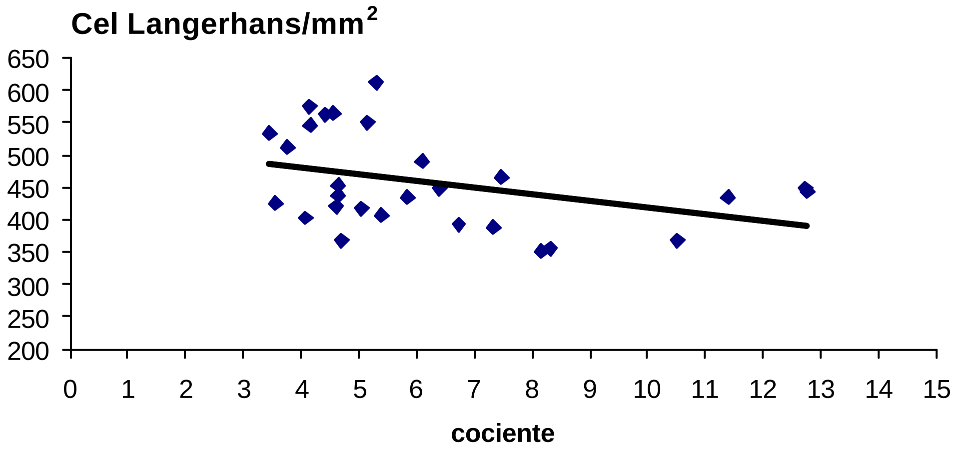


Figura 49. Correlación negativa entre el número de células de Langerhans y el cociente GSH/GSSG eritrocitario.

Observamos una correlación negativa entre el número de células de Langerhans y el cociente GSH/GSSG eritrocitario.

Esta relación se podría expresar por la siguiente fórmula: *células de Langerhans = -10,313 cociente + 522,16*

La correlación entre la actividad CAT eritrocitaria y el número de células de Langerhans se muestra en la figura 50.

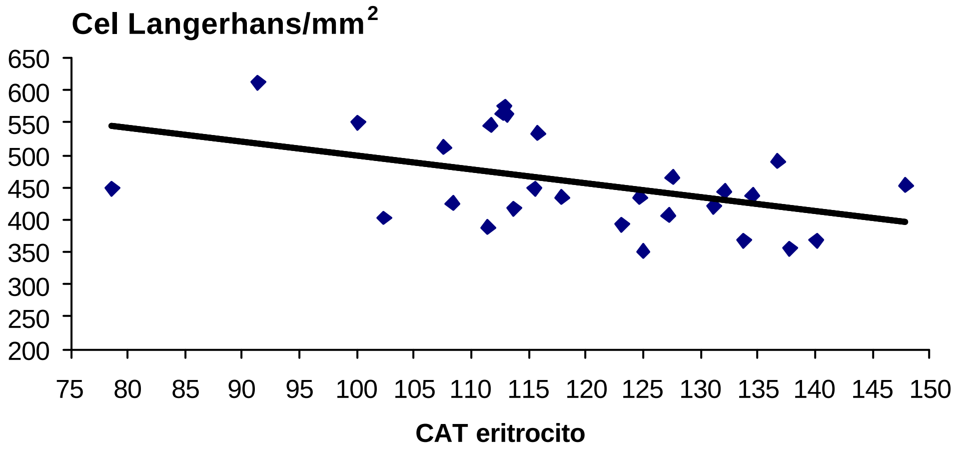


Figura 50. Correlación negativa entre el número de células de Langerhans y la actividad de la enzima CAT en eritrocito.

Se observó que a medida que disminuía el número de células de Langerhans, la actividad enzimática de la catalasa disminuyó; la relación se podría expresar gracias a la siguiente fórmula: *células de Langerhans = -2,1652CAT + 715,48*

La correlación entre la actividad GPx eritrocitaria y el número de células de Langerhans se muestra en el gráfico de la figura 51.

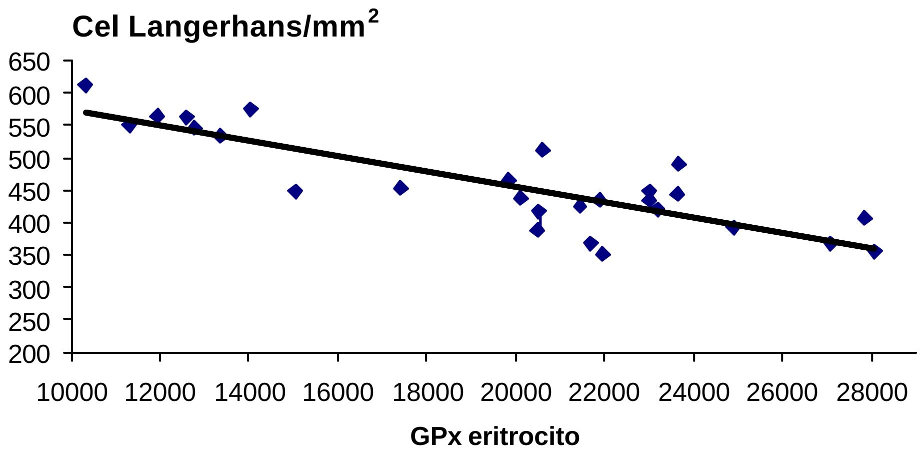


Figura 51. Correlación negativa entre el número de células de Langerhans y la actividad de la enzima GPx en eritrocitos.

La disminución en el número de células de Langerhans se veía acompañada por un aumento en la actividad de esta enzima.

La correlación se podría expresar por la siguiente fórmula: *células de Langerhans = - 0,0119 GPx eritrocito + 691,6*

La relación entre el número de células de Langerhans y la actividad GST en epidermis expresada por mg de proteína se muestra en la figura 52.

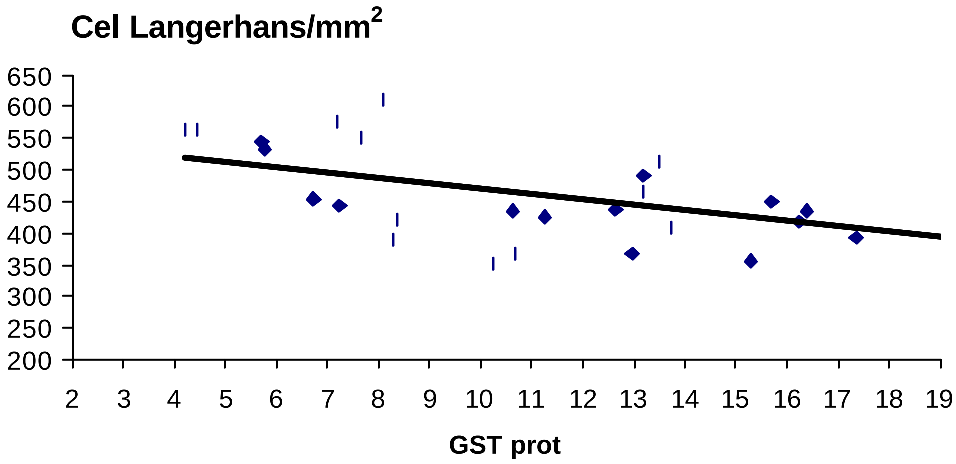


Figura 52. Correlación negativa entre el número de células de Langerhans y la actividad de la enzima GST en epidermis (expresado por proteínas).

El número de células de Langerhans disminuyó a medida que aumentó la actividad de esta enzima.

La correlación se podría expresar per la fórmula: *células de Langerhans = - 8,4073 GST proteína + 553,43*

La actividad catalasa por mg de proteína y el número de células de Langerhans se correlacionaron de forma negativa tal como se muestra en la figura 53.

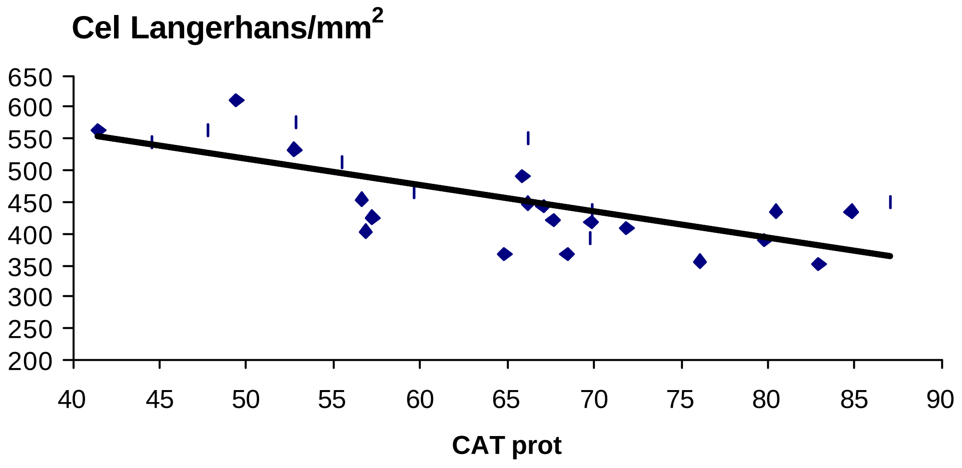


Figura 53. Correlación negativa entre el número de células de Langerhans y la actividad de la enzima catalasa en epidermis.

Una disminución en el número de células de Langerhans se acompañó de un aumento de la actividad de esta enzima.

La fórmula que expresa esta correlación, es la siguiente : *células de Langerhans* = *-4,2004 CAT prot + 729,66.*

El contenido de glutatión oxidado por mg de proteína presentó una correlación positiva respecto al número de células de Langerhans que podemos ver en la figura 54.

Observamos que a medida que dismuyó el número de células de Langerhans, menor fue también el contenido de GSSG en epidermis (por mg de proteína).

La correlación existente se podría expresar mediante la siguiente fórmula: *células de Langerhans = 10,504 GSSG prot + 267,86.*

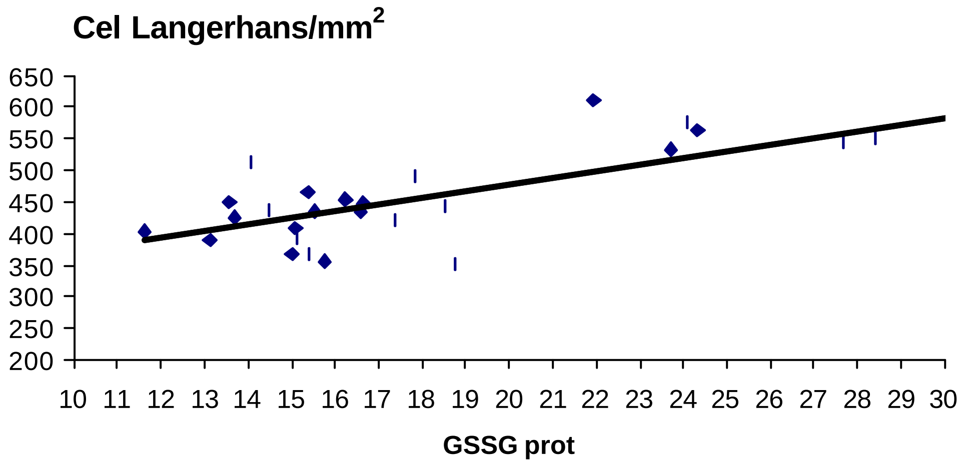


Figura 54. Correlación positiva entre el número de células de Langerhans y el contenido de glutatión oxidado en epidermis (por miligramo de proteína).

La actividad de la enzima GST en tejido presentó una correlación negativa respecto al número de células de Langerhans, tal como se muestra en la figura 55.

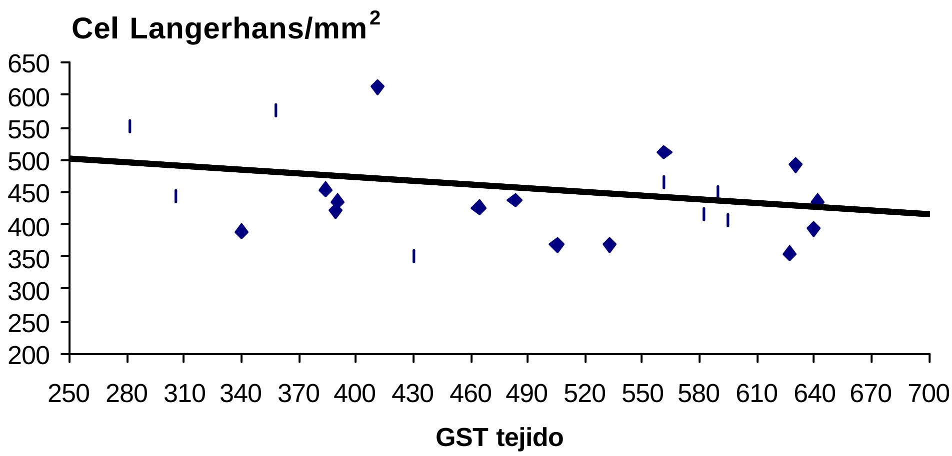


Figura 55. Correlación negativa entre el número de células de Langerhans y la actividad de la enzima GST en epidermis.

De forma que la disminución en el número de células de Langerhans se acompañó por un incremento de la actividad GST en epidermis (expresada por g de tejido).

Esta correlación se puede expresar mediante la siguiente fórmula: *células de Langerhans = -0,1912 GST tejido + 548,86*.

La actividad CAT en tejido presentó una correlación negativa con el número de células de Langerhans como podemos ver en la figura 56.

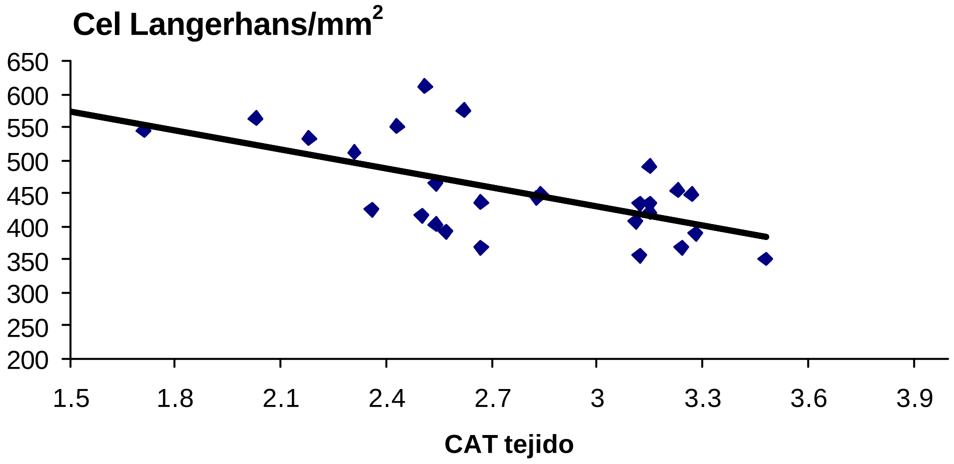


Figura 56. Correlación negativa entre el número de células de Langerhans y la actividad de la catalasa en epidermis (por gramo de tejido).

De forma que una disminución en el número de células de Langerhans se acompañó por un aumento en la actividad de esta enzima.

La fórmula que representa la correlación existente, es la siguiente: *células de Langerhans = -95,87 CAT tejido + 718,17*

El contenido de glutatión oxidado en tejido presentó una correlación positiva respecto al número de células de Langerhans, tal como se muestra en la figura 57.

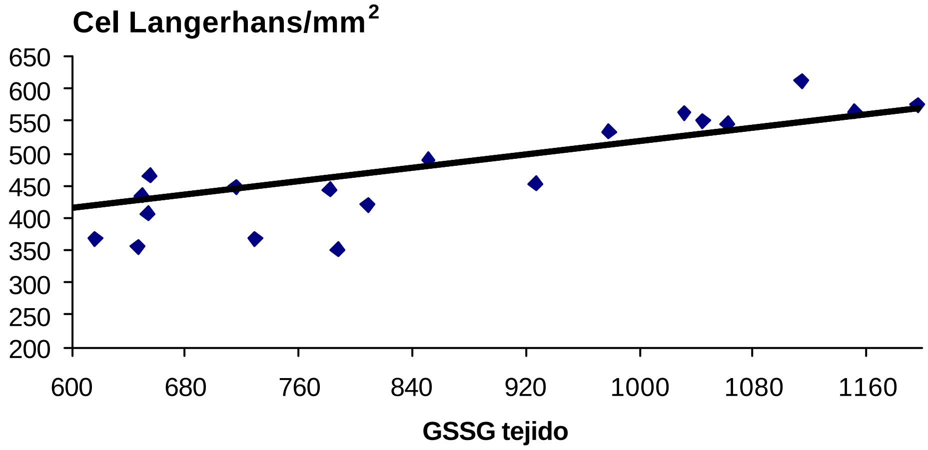


Figura 57. Correlación positiva entre el número de células de Langerhans y el contenido de glutatión oxidado en epidermis (por gramo de tejido).

De forma que una disminución en el número de células de Langerhans se acompañó por un menor contenido del glutatión oxidado en epidermis.

La correlación existente se puede expresar mediante la siguiente fórmula: *células de Langerhans = 0,2592 GSSG tejido + 260,46*

2.5.2. Regresiones lineales múltiples

Para observar la relación entre las CL y el estrés oxidativo también se realizó el análisis de regresión lineal múltiple (R^2) en eritrocitos, plasma y epidermis. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Variable dependiente	**Variable predictivas**	**Coef. B ± ET**	**R^2**	**F; *p***
CÉLULAS DE LANGERHANS	ERITROCITO: • GPx • GSH • Constante	-0,011 ± 0,002 26,403 ± 10,871 555,064 ± 63,467	0,741	34,299; < 0,001 $GL_{2,24}$
	EPIDERMIS (mg prot): • GSSG • CAT • Constante	7,196 ± 2,002 -2,395 ± 0,853 482,778 ± 82,375	0,667	24,990; < 0,001 $GL_{2,25}$
	EPIDERMIS (g tejido): • GSSG • CAT • Constante	0,203 ± 0,039 -56,047 ± 17,311 455,471 ± 32,389	0,723	32,557; < 0,001 $GL_{2,25}$

Tabla 63. Variables predictoras halladas mediante el análisis de la regresión lineal múltiple en eritrocitos y en epidermis; en plasma no se halló ninguna variable predictora. F proviene de la varianza del análisis y se incluyen los grados de libertad (GL) (el primer término indica el número de grados de libertad de la regresión y el segundo representa los grados de libertad de la residual). Se muestra también la significación estadística (*p*) de los coeficientes B y del análisis de la varianza (F).

El análisis de las posibles correlaciones entre los diversos parámetros estudiados en nuestro trabajo, en función de las pautas de irradiación agudas utilizadas, demostró que los valores de "r" fueron pequeños cuando se calcularon las correlaciones de Pearson. Es decir, relacionando el número de células de Langerhans con el resto de indicadores de RLO, la implicación de cada uno de estos parámetros fue baja cuando los consideramos de forma individual. Por esta razón, hemos realizado el estudio de su peso relativo. De esta forma se comprobó que los valores de "R^2" fueron mucho más elevados que en las correlaciones de Pearson. Por ejemplo, valores de R^2 = 0,75 quiere decir que los parámetros implicados están condicionando hasta un 75% el número de células de Langerhans.

En eritrocitos, las variables predictoras de las CL fueron la GPx y el GSH con un valor de R^2 de 0,74, mientras que en epidermis las variables resultaron ser el GSSG y la CAT, tanto si se expresaban por mg de proteína (R^2 = 0,67) como por gramo de tejido (R^2 = 0,72). En plasma no hubo ningún parámetro predictor del número de CL.

Estos resultados concuerdan con las tendencias que observamos tanto en el estudio estadístico de los parámetros relacionados con los RLO por el test de ANOVA, como con el estudio de las correlaciones lineales. Por tanto, todo ello sugiere que probablemente hay una relación entre la disminución de las CL, es decir la inmunidad celular, y la producción de RLO debido a la RUV. Claramente, diferentes compuestos y enzimas del eje del glutatión y la CAT se vieron afectados por la RUV, por ejemplo, la GST, la GPx, el GSH y el GSSG se modificaron según el grado de intensidad RUV recibida, al mismo tiempo que disminuyó el número de CL.

3. RESULTADOS RELATIVOS A LOS RLO EN IRRADIACIONES CRÓNICAS

3.1 Resultados del tratamiento con irradiación durante 2 meses

SANGRE

	CONTROL	p	IRRADIACIÓN 2 MESES
GST total µmol/min/g Hb	1268,83±196,40	0,033	1034,83±121,82
GST 52º µmol/min/g Hb	138,90±30,78	0,041	103,71±17,19
Residual %	10,87±1,066	NS	10,14±2,05
GSH eritrocito µmol/g Hb	4,54±0,909	NS	5,97±1,59
GSSG eritrocito µmol/g Hb	1,01±0,24	NS	0,75±0,32
GSH/GSSG eritrocito	4,75±1,54	0,015	8,68±2,91
TBARS eritrocito Nmol/g Hb	4,27±0,32	<0,001	3,44±0,15
CAT Mmol/min/g Hb	97,39±8,9	NS	97,33±26,76
GPx Mmol/min/g Hb	55,43±5,18	NS	64,89±9,45
GR µmol/min/g Hb	378,31±31,30	NS	375,74±89,79
SOD U/ g Hb	1990±463,75	NS	2449±246,21
GSH plasma nmol/ml	19,93±3,96	NS	22,34±5,52
GSSG plasma nmol/ml	34,92±8,37	NS	38,13±3,69
GSH/GSSG plasma	0,62±0,31	NS	0,58±0,13
TBARS plasma nmol/ml	3,26±0,46	NS	2,76±0,345

Tabla 64. Resultados de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo en eritrocitos en el tratamiento de 2 meses de irradiación. n = 6 en cada grupo.

GST: la actividad total de esta enzima disminuyó significativamente en las ratas irradiadas respecto al lote control un 20%; por otro lado, la actividad GST termoestable disminuyó también un 25% respecto al control.

GSH y GSSG: los niveles eritrocitarios y plasmáticos de GSH no fueron significativamente diferentes en este tratamiento, pero la relación GSH/GSSG aumentó significativamente un 82% en las ratas irradiadas debido principalmente al aumento de GSH.

TBARS: el contenido de TBARS eritrocitario disminuyó un 20% en los animales irradiados respecto al control.

Otras enzimas: no se observaron diferencias significativas en el resto de parámetros eritrocitarios.

EPIDERMIS

	CONTROL	p	IRRADIACIÓN 2 MESES
GST nmol/min/mg prot	**8,05±1,089**	**0,001**	**12,41±2,15**
GST nmol/min/g tej.	**358,65±67,44**	**0,006**	**516,55±90,18**
CAT µmol/min/mg prot	**45,52±4,46**	**NS**	**46,73±2,71**
CAT µmol/min/g tej.	**2,01±0,22**	**NS**	**1,94±0,092**
TBARS nmol/mg prot	**31,90±7,19**	**NS**	**39,55±14,24**
TBARS nmol/g tej.	**1,39±0,20**	**NS**	**1,64±0,59**
GSH nmol/ mg prot	**13,59±1,91**	**0,011**	**20,85±4,66**
GSH nmol/g tej.	**600,85±72,38**	**0,025**	**871,40±213,19**
GSSG nmol/ mg prot	**14,35±2,64**	**0,036**	**18,11±2,75**
GSSG nmol/g tej.	**637,11±131,73**	**NS**	**753,85±116,1**
GSH/GSSG	**0,96±0,15**	**NS**	**1,17±0,29**
GPx µmol/min/mg prot	**45,09±5,25**	**NS**	**42,18±5,47**
GPx µmol/min/g tej.	**1990±152,84**	**NS**	**1754,33±219,80**
GR µmol/min/mg prot	**11,28±1,51**	**NS**	**11,17±1,70**
GR µmol/min/g tej.	**498,16±50,17**	**NS**	**465,16±72,56**
SOD U/mg prot	**14,32±4,13**	**NS**	**10,90±2,11**
SOD U/g tej.	**631,67±178,17**	**0,049**	**452,67±81,107**
Proteínas mg prot/gr tej.	**44,42±4,00**	**NSS**	**41,61±1,08**

Tabla 65. Resultados de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo en epidermis en el tratamiento de 2 meses de irradiación. n = 6 en cada grupo.

GST: se observó una variación significativa en la actividad GST tanto si lo expresamos por proteínas como si lo hacemos por tejido. Esta variación resultó en un incremento del 54% por proteínas y del 44% si lo referimos a tejido.

CAT: no se halló ninguna variación significativa de la actividad catalasa.

TBARS: no variaron significativamente los niveles de TBARS en epidermis.

GSH y GSSG: en animales irradiados, el contenido de glutatión reducido (GSH) aumentó significativamente un 53% y el glutatión oxidado (GSSG) aumentó un 26% respecto al control.

Otras enzimas: la SOD disminuyó significativamente un 40% su actividad en animales irradiados respecto al control.

Proteínas: no hubo variación significativa del contenido de proteínas entre los dos lotes de animales.

3.1.1 Resultados del test de sensibilización

En los resultados del test de sensibilización observamos que la media de las diferencias de grosor entre la oreja con sensibilizante (derecha) y la oreja con excipiente (izquierda) fue significativamente superior en los animales control que en los irradiados, tanto a las 24 horas (0,225µm vs. 0,1167µm) como a las 48 horas (0,2967µm vs. 0,055µm) (figura 58).

Respecto al eritema, la puntuación asignada a la oreja derecha de los controles a las 24 horas fue de 4 y en la oreja izquierda de 0, con una significación de $p= 0,024$; mientras que, en los animales irradiados, las respectivas puntuaciones a las 24 horas fueron 1,5 y 0,66 ($p= 0,102$). La puntuación asignada a la oreja derecha de los controles a las 48 horas fue de 4 y en la oreja izquierda de 0, con una significación de $p= 0,024$; mientras que en los animales irradiados las respectivas puntuaciones a las 48 horas fueron 1,5 y 0,5 ($p= 0,063$) (tabla 66).
Respecto al área de afectación de las orejas después de la sensibilización, la puntuación asignada a la oreja derecha de los controles a las 24 horas fue de 3 y en la oreja izquierda de 0, con una significación de $p= 0,014$; mientras que en los animales irradiados las respectivas puntuaciones a las 24 horas fueron 1,16 y 0,33

(p= 0,102). La puntuación asignada a la oreja derecha de los controles a las 48 horas fue de 3 y en la oreja izquierda de 0, con una significación de p= 0,014; mientras que en los animales irradiados las respectivas puntuaciones a las 48 horas fueron 1,5 y 0,33 (p= 0,066) (tabla 66).

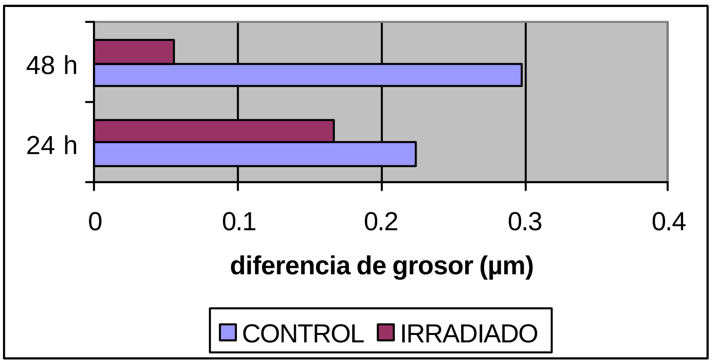


Figura 58. Diferencia en el grosor, expresado en µm, entre las dos orejas en los animales control e irradiados a las 24 y 48 h desde la aplicación del agente sensibilizante.

	CONTROL	IRRADIADO
Diferencia eritema 24 h	p = 0,024	p = 0,102
Diferencia eritema 48 h	p = 0,024	p = 0,063
Diferencia área 24 h	p = 0,014	p = 0,102
Diferencia área 24 h	p = 0,014	p = 0,066

Tabla 66. Significación estadística de la diferencia de eritema y área afectada en ambas orejas a las 24 y 48 h entre animales control e irradiados.

3.2 Resultados del tratamiento con irradiación durante 3 meses

SANGRE

	CONTROL	p	IRRADIACIÓN 3 MESES
GST total µmol/min/g Hb	974,5±175,73	NS	1019,50±147,53
GST 52º µmol/min/g Hb	71,68±22,18	NS	78,91±19,05
Residual %	7,22±0,92	NS	7,73±1,45
GSH eritrocito µmol/g Hb	5,26±1,40	NS	5,58±0,65
GSSG eritrocito µmol/g Hb	1,94±0,44	NS	2,17±0,58
GSH/GSSG eritrocito	2,89±1,18	NS	2,68±0,65
TBARS eritrocito nmol/g Hb	2,97±0,51	NS	3,36±0,92
CAT mmol/min/g Hb	112,21±4,03	NS	112,12±6,19
GPx mmol/min/g Hb	12,8±0,92	NS	12,63±0,61
GR µmol/min/g Hb	349,63±61,75	NS	313,59±70,92
SOD U/ g Hb	1075,49±178,45	NS	1557,77±503,41
GSH plasma nmol/ml	17,10±4,72	0,010	9,77±3,21
GSSG plasma nmol/ml	76,75±8,44	NS	73,38±9,49
GSH/GSSG plasma	0,22±0,06	0,012	0,13±0,04
TBARS plasma nmol/ml	1,38±0,49	NS	1,41±0,22

Tabla 67. Resultados de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo en eritrocito en el tratamiento de 3 meses de irradiación. n = 6 en cada grupo.

En este caso, sólo hallamos diferencias significativas en los valores de GSH plasmático que disminuyó un 70%. Esto determinó una disminución significativa del cociente GSH/GSSG plasmático.

EPIDERMIS

	CONTROL	p	IRRADIACIÓN 3 MESES
GST nmol/min/mg prot	16,40±3,38	NS	17,44±4,59
GST nmol/min/g tej.	407,86±115,36	NS	402,58±114,12
CAT µmol/min/mg prot	76,69±8,15	NS	73,98±15,41
CAT µmol/min/g tej.	1,89±0,23	NS	1,64±0,26
TBARS nmol/mg prot	92,2±17,62	NS	83,50±24,94
TBARS nmol/g tej.	2,30±0,61	NS	1,93±0,73
GSH nmol/ mg prot	10,54±4,91	NS	8,79±2,17
GSH nmol/g tej.	269,63±158,03	NS	193,46±30,27
GSSG nmol/ mg prot	60,25±7,32	NS	62,56±14,37
GSSG nmol/g tej.	1495,51±307,43	NS	1376,85±126,86
GSH/GSSG	0,17±0,061	NS	0,14±0,026
GPx µmol/min/mg prot	47,62±8,16	NS	51,36±9,34
GPx µmol/min/g tej.	1165,50±159,44	NS	1153,50±233,862
GR µmol/min/mg prot	17,58±4,07	NS	20,66±4,62
GR µmol/min/g tej.	425,66±53,60	NS	455,33±30,58
SOD U/mg prot	13,17±5,24	NS	12,70±3,46
SOD U/g tej.	346,32±156,32	NS	307,89±86,84
Proteínas mg prot/gr tej.	24,92±4,43	NS	22,92±5,08

Tabla 68. Resultados de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo en epidermis en el tratamiento de 3 meses de irradiación. n = 6 en cada grupo.

Como se observa en la tabla anterior, no se obtuvieron variaciones significativas en ningún parámetro epidérmico para una irradiación crónica de 3 meses.

3.3. Resultados del tratamiento con irradiación durante 5 meses

SANGRE

	CONTROL	p	IRRADIACIÓN 5 MESES
GST total µmol/min/g Hb	943±130,52	NS	866,33±83,36
GST 52º µmol/min/g Hb	90,26±18,67	NS	93,13±12,08
Residual %	9,54±1,17	NS	10,75±1,01
GSH eritrocito µmol/g Hb	6,66±0,59	NS	6,77±1,17
GSSG eritrocito µmol/g Hb	1,41±0,33	NS	1,50±0,52
GSH/GSSG eritrocito	5,02±1,55	NS	4,85±1,42
TBARS eritrocito nmol/g Hb	3,82±3,47	NS	4,63±2,89
CAT mmol/min/g Hb	109,44±8,7	0,014	93,98±9,38
GPx mmol/min/g Hb	17,73±0,77	NS	17,28±0,68
GR µmol/min/g Hb	292,21±77,95	NS	365,58±98,62
SOD U/ g Hb	1841,33±431,86	NS	1632,33±502,56
GSH plasma nmol/ml	54,91±12,92	NS	55,83±4,98
GSSG plasma nmol/ml	53,59±5,44	NS	52,51±7,47
GSH/GSSG plasma	1,02±0,21	NS	1,08±0,18
TBARS plasma nmol/ml	1,70±0,26	NS	1,51±0,28

Tabla 69. Resultados de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo en eritrocitos en el tratamiento de 5 meses de irradiación. n = 6 en cada grupo.

En el modelo de irradiación crónica durante 5 meses sólo hallamos las siguientes diferencias significativas en eritrocitos:

CAT: Disminuyó un 16% en animales irradiados respecto al control.

EPIDERMIS

	CONTROL	p	IRRADIACIÓN 5 MESES
GST nmol/min/mg prot	**23,58±10,39**	**NS**	**18,90±6,65**
GST nmol/min/g tej.	**506,7±169,95**	**NS**	**439,48±177,78**
CAT µmol/min/mg prot	**85,11±31,50**	**NS**	**80,09±18,59**
CAT µmol/min/g tej.	**1,87±0,57**	**NS**	**1,83±0,35**
TBARS nmol/mg prot	**84±48,21**	**NS**	**81,25±37,03**
TBARS nmol/g tej.	**1,68±0,44**	**NS**	**1,85±0,80**
GSH nmol/ mg prot	**56,36±17,66**	**NS**	**64,18±9,09**
GSH nmol/g tej.	**1268,26±440,19**	**NS**	**1471,73±124,09**
GSSG nmol/ mg prot	**41,83±18,98**	**NS**	**43,84±7,56**
GSSG nmol/g tej.	**884,36±276,45**	**NS**	**1005,63±144,20**
GSH/GSSG	**1,45±0,47**	**NS**	**1,48±0,22**
GPx µmol/min/mg prot	**41,55±10,48**	**NS**	**46,58±5,73**
GPx µmol/min/g tej.	**955,17±330,31**	**NS**	**1078±179,04**
GR µmol/min/mg prot	**8,79±5,09**	**NS**	**8,86±1,68**
GR µmol/min/g tej.	**177,5±32,06**	**NS**	**204,83±39,31**
SOD U/mg prot	**18,13±11,24**	**NS**	**15,32±3,47**
SOD U/g tej.	**370,50±118,08**	**NS**	**352,83±75,59**
Proteínas mg prot/gr tej.	**24,91±10,25**	**NS**	**21,63±2,98**

Tabla 70. Resultados de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo en epidermis en el tratamiento de 5 meses de irradiación. n = 6 en cada grupo.

Como se observa en la tabla anterior, no se obtuvieron variaciones significativas en ningún parámetro epidérmico después de una irradiación crónica de 5 meses.

3.3.1. Resultados de los marcadores de hidroxilación del DNA en irradiaciones de 5 meses.

En la figura 59 se muestran las imágenes de la inmunohistoquímica realizada para determinar la 8-OH-desoxiguanosina en los cortes de piel de los animales irradiados crónicamente.

Las figuras 59a y 59b corresponden a la piel de un animal control de 9 semanas, a 20 y 40 aumentos respectivamente. Se observa que la 8-OH-desoxiguanosina, como metabolito presente cuando hay daño en el DNA, sólo aparecía teñida de color marrón en las capas más externas de la epidermis, cercanas a la capa córnea y en las células más maduras de las glándulas sebáceas. El resto de capas epidérmicas, hasta la membrana basal y las zonas donde crecen las células de las glándulas sebáceas no presentaron tinción.

Las figuras 59c y 59d corresponden a un animal control pseudoirradiado durante 5 meses, a 20x y 40x respectivamente. Observamos que en este caso, al ser ratas de mayor edad, aparecieron teñidas, también, algunas células de capas más profundas de la epidermis, sin llegar a la membrana basal. Las glándulas sebáceas estaban también teñidas de marrón, lo que servía como control positivo.

Finalmente, las figuras 59e y 59f son las imágenes de un animal irradiado durante 5 meses, a 20x y 40x respectivamente. En este caso, se observaron claramente teñidas las glándulas sebáceas, excepto en los polos más internos donde las células son más jóvenes, y todas las capas epidérmicas incluso la membrana basal, lo que demuestra un mayor daño en el DNA en estos animales.

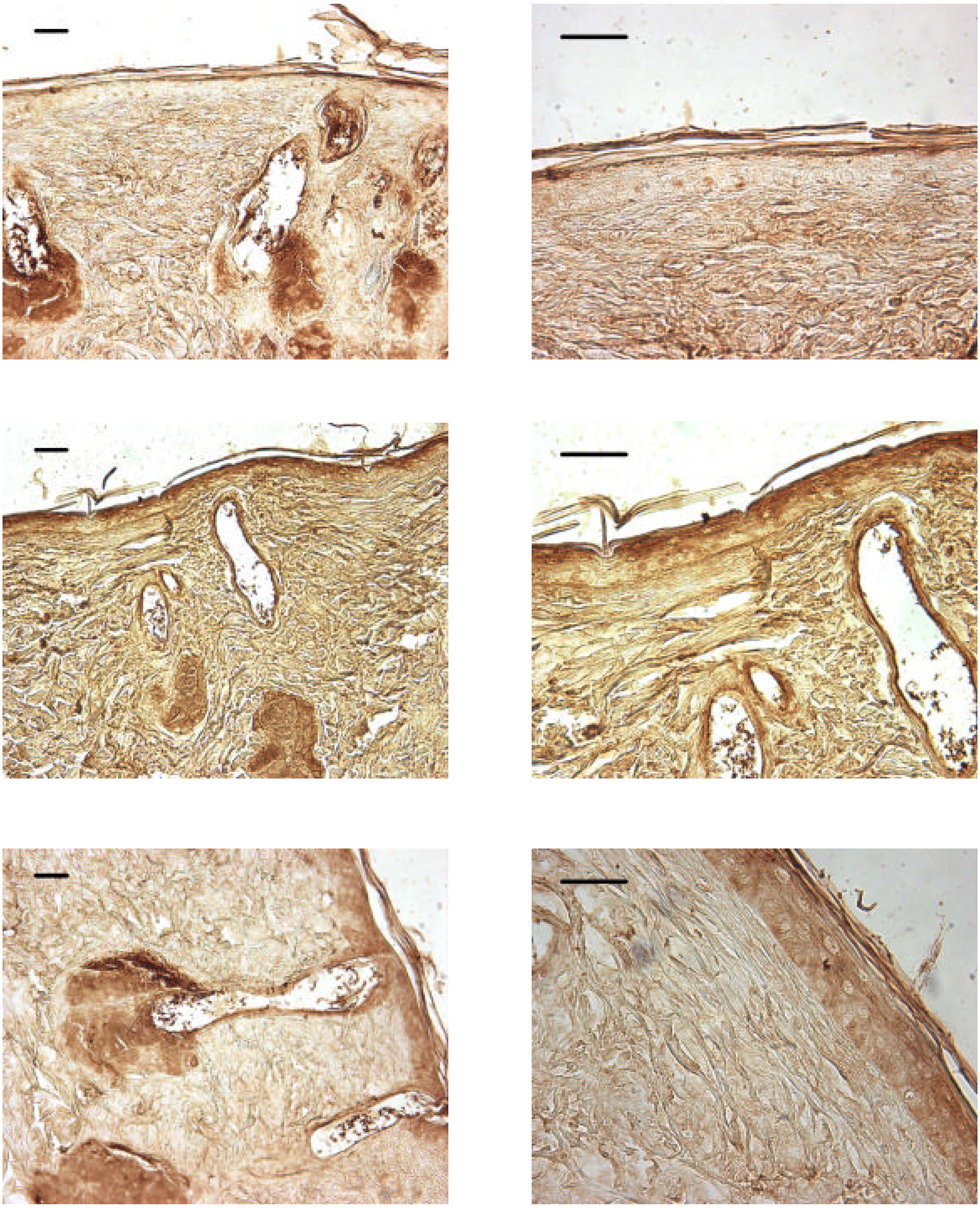


Figura 59. Localización de derivados hidroxilados de ácidos nucleicos en piel de rata *hairless* por la técnica inmunohistoquímica de la peroxidasa. a, b: piel de animal control de 9 semanas de edad (20x y 40x, respectivamente); c, d: piel de animal control de 5 meses (20x y 40x, respectivamente); e, f: piel de animal irradiado con UVB, dosis semanal 0,61 DEM a lo largo de 5 meses (20x y 40x, respectivamente). La marca en cada imagen equivale a 50 µm.

3.4 Análisis y discusión de los resultados obtenidos tras la irradiación crónica.

Estos resultados demuestran que la RUV es capaz de alterar diversos parámetros relacionados con el estrés oxidativo, tanto en eritrocitos como en epidermis, aún a dosis claramente suberitemógenas pero repetidas. Por otra parte, aparecen también importantes alteraciones en la capacidad de respuesta de las células de Langerhans, junto con modificaciones morfológicas y disminución del número de las mismas. En cuanto a los parámetros bioquímicos, las alteraciones observadas fueron más abundantes tras el período más corto de irradiación (2 meses) y desaparecieron casi completamente en los animales irradiados durante 5 meses. Estas diferencias se explican básicamente porque la cantidad de energía UV recibida por día en los animales irradiados 2 meses fue mayor que en los irradiados durante 3 meses y aún mayor que en los irradiados 5 meses.

Es interesante el hecho de que tras la irradiación crónica de dos meses la actividad GST eritrocitaria disminuya en comparación con los controles pseudoirradiados. En cambio, dicha enzima aumentó en los animales irradiados de forma aguda (ver resultados anteriores, tabla 19). Ello puede explicarse por una alteración molecular de la enzima inducida por la producción de ERO y de sustancias electrofílicas en general durante un tiempo relativamente prolongado. La disminución de la actividad GST termoestable apoyaría esta hipótesis, ya que una disminución de la actividad GST termoestable se acompaña de una disminución de la afinidad de la enzima (valores de K_m superiores), tal como se demostró anteriormente en otros trabajos (Ortín et al., 1996). Esta disminución de la actividad GST tampoco puede achacarse a una disminución de la disponibilidad de GSH, ya que la concentración eritrocitaria de este tripéptido no se modificó en los animales irradiados, al contrario, mostró una tendencia a aumentar, junto con un cociente GSH/GSSG más favorable en los animales irradiados. En conjunto, estos dos cambios, sugieren una situación latente de estrés oxidativo, debida a la RUV continuada, que induce una mayor disponibilidad del GSH para la actividad de la GST, a pesar de que ésta probablemente se encuentra en una situación de alteración alostérica negativa para su función.

Por último, con los datos disponibles, no podemos explicar la disminución de la actividad CAT eritrocitaria observada tras cinco meses de irradiación, ya que el resto de parámetros se mantuvieron sin variaciones significativas en comparación con los animales pseudoirradiados.

Los cambios observados en la epidermis, tras la RUV crónica reproducen también el incremento de actividad GST observado en la irradiación aguda, pero con una diferencia interesante: el GSH aumenta tras la RUV crónica durante dos meses, mientras que disminuía o no se modificaba en las pautas de irradiación aguda. Este hecho indicaría una mayor actividad del sistema glutatión sintetasa, para mantener el nivel de actividad exigido por parte de la GST. Al mismo tiempo, parece claro que el tipo de ERO, y de compuestos electrofílicos en general, derivados de la acción de la RUV sobre la epidermis sigue mayoritariamente la vía detoxificadora de la GST, ya que no se alteran los valores de la GPx ni de la GR. La disminución de la actividad SOD observada tras dos meses de RUV, es un resultado opuesto al observado tras la irradiación aguda. Ello puede explicarse por una saturación de la actividad de la enzima, por exceso de formación de aniones superóxido, tras un período transitorio de inducción de la enzima (irradiación aguda).

En cualquier caso, la formación de hidroperóxidos parece suficientemente neutralizada por los restantes sistemas (CAT, GST, GPx), ya que no se llega a observar un aumento de los valores de TBARS en ninguna de las pautas de RUV continuada. En este sentido, recordemos que sólo observamos un aumento de TBARS epidérmicos en irradiaciones agudas equivalente a 1,56 DEM.

Como decíamos antes, es plausible que la escasa afectación de los parámetros bioquímicos observada en los animales irradiados durante cinco meses, en comparación con los irradiados durante dos meses, se deba simplemente a que la dosis/día recibida fue menor en los irradiados durante cinco meses. De todos modos, esto contrasta con el hecho de que el número de células de Langerhans se mantiene disminuido incluso en los animales irradiados durante cinco meses. Así pues, las CL constituirían el elemento más afectado de todos los estudiados, independientemente del nivel de irradiación aplicado. La renovación de la población de CL en la epidermis se hace a expensas de nuevas células predendríticas que

llegan de la médula ósea, a través de los precursores sanguíneos indiferenciados. No sabemos cuál es el ritmo normal de repoblación de CL en la rata *hairless* y, por otra parte, este aspecto ha sido muy poco estudiado en otras especies (Banchereau y Steinman, 1998; Beissert et al., 2001; Hart et al., 2002). En cualquier caso, la implantación de nuevas CL en la epidermis depende fundamentalmente de dos factores: de la llegada de nuevas células y de la posibilidad de que estas nuevas células puedan insertarse correctamente entre los queratinocitos. La disminución del número de células de Langerhans tras cinco meses de irradiación, aún tratándose de pautas de irradiación muy suaves, hace pensar en que probablemente se alteran de manera persistente los mecanismos de señalización que permiten a las nuevas CL asentarse entre la población de queratinocitos.

Las pruebas de sensibilización en los animales irradiados durante dos meses muestran una pérdida de la funcionalidad de las CL frente a las reacciones de hipersensbilidad, ya que, en los animales irradiados previamente a la sensibilización, no se observan diferencias significativas en el grosor de la oreja tratada con sensibilizante respecto a la oreja con excipiente, y tampoco signos de eritema ni mayor área de reacción. Este hecho nos indica que la irradiación a dosis suberitemógenas, pero repetidas, provoca una disminución de la función inmunitaria de las CL y deja sin defensas a la capa epidérmica. Además, los resultados observados del aumento de hidroxilación de los ácidos nucleicos, en todas las capas epidérmicas de los animales irradiados durante cinco meses (Figura 59), refuerzan la idea de que existe riesgo de carcinogénesis en irradiaciones continuadas suberitemógenas.

4. RESULTADOS RELATIVOS A LOS RLO EN RATAS TRATADAS CON FILTRO

4.1. Efecto de la irradiación

	CONTROL	IRRADIADO
Residual %	6,46±1,68	9,77±2,32
GSH eritro. µmol/g Hb	3,30±0,98	4,61±0,88
GSSG eritro. µmol/g Hb	1,13±0,47	0,62±0,12
GSH/GSSG	3,02±0,57	7,57±1,24
GPX eritro. mmol/min/g Hb	46,14±4,38	39,99±5,01
GSH plasma nmol/ml	40,31±7,71	30,96±1,57
GSSG plasma nmol/ml	40,93±6,99	28,01±6,03
GST epi. nmol/min/mg prot.	8,15±2,30	13,23±3,09
GST epi. nmol/min/g tej.	265,91±74,79	442,24±124,7
TBARS epi. nmol/mg prot.	64,62±16,70	43,00±10,75
TBARS epi. nmol/g tej.	2,09±0,37	1,40±0,27
GSH epi. nmol/mg prot.	16,48±3,06	11,99±2,41
GSH epi. nmol/g tej.	536,81±76,12	398,34±83,02
GSSG epi. nmol/mg prot.	17,57±2,24	13,26±1,54
GSSG epi. nmol/g tej.	576,24±75,96	439,74±60,73
GPX epi. µmol/min/mg prot.	34,72±1,35	44,33±3,72
GPX epi. µmol/min/g tej.	1426±175	1835±206
GR epi. µmol/min/mg prot.	9,40±1,54	11,11±1,22

Tabla 71. Parámetros significativamente distintos entre los animales control y los animales irradiados. p<0,05.

En eritrocitos, la irradiación aumentó el porcentaje de GST residual, así como el cociente GSH/GSSG ya que aumentó el GSH y disminuyó el GSSG, y se observó también una disminución en la actividad GPX. En plasma disminuyeron tanto el GSH como el GSSG. En epidermis, se activaron algunos sistemas enzimáticos como la GST, la GPX y la GR, éstos consiguen mantener la piel sin otras alteraciones bioquímicas siempre que exista aporte suficiente de GSH. Éste se halló disminuido en la epidermis irradiada debido a su consumo como substrato por parte de las dos enzimas (GST y GPX) citadas; pero ambos sistemas detoxificadores parecían funcionar porque los TBARS en epidermis irradiada estaban también disminuidos respecto al control.

4.2. Efecto de la irradiación en animales con filtro

	CONTROL+ FILTRO	IRRADIADO + FILTRO
GST 52º µmol/min/g Hb	**81,02±16,69**	**102,24±16,72**
Residual %	**9,67±1,40**	**11,48±1,20**
GSH eritro. µmol/g Hb	**4,41±0,78**	**5,65±0,83**
GPX eritro. mmol/min/g Hb	**43,29±3,24**	**38,97±2,20**
CAT epi. µmol/min/mg prot.	**32,81±2,75**	**45,00±2,63**
CAT epi. µmol/min/g tej.	**1,55±0,46**	**2,17±0,13**
GPX epi. µmol/min/mg prot.	**26,59±1,83**	**31,66±4,14**

Tabla 72. Parámetros significativamente distintos entre los animales control con filtro y los animales irradiados con filtro. $p<0,05$.

Al comparar los animales control con filtro con los animales irradiados con filtro se observaron sólo siete parámetros con diferencias significativas. Algunos de estos parámetros aparecieron también alterados en el mismo sentido en animales irradiados sin filtro cuando los comparábamos con los controles sin filtro. Dichos parámetros fueron: un aumento del porcentaje residual, un aumento del GSH y de la GPX, todo ello en eritrocitos; y un aumento de la GPX en epidermis. Por tanto,

podemos concluir que estos cuatro efectos causados por la irradiación no se ven modificados en los animales irradiados aunque lleven un fotoprotector. En cambio, había un aumento de la GST termoestable y de la CAT epidérmica en los animales irradiados con filtro, que no aparecía en los animales irradiados respecto a sus controles.

4.3. Efectos del filtro

	CONTROL	CONTROL + FILTRO
GST 52º µmol/min/g Hb	**52,51±14,44**	**81,02±16,69**
Residual %	**6,46±1,68**	**9,67±1,40**
GSH eritro. µmol/g Hb	**3,30±0,98**	**4,41±0,78**
TBARS eritro. nmol/g Hb	**4,98±1,06**	**6,24±0,82**
CAT eritro. mmol/min/g Hb	**100,52±8,45**	**493,27±78,89**
GSH plasma nmol/ml	**40,31±7,71**	**13,40±2,33**
GSSG plasma nmol/ml	**40,93±6,99**	**65,22±6,24**
GSH/GSSG plasma	**0,99±0,20**	**0,20±0,04**
TBARS plasma nmol/ml	**3,08±0,27**	**1,38±0,36**
GST epi. nmol/min/g tej.	**265,91±74,79**	**449,64±190**
GSH epi. nmol/g tej.	**536,81±76,12**	**248,88±80,50**
GSSG epi. nmol/g tej.	**576,24±75,96**	**2042±505**
GSH/GSSG epi.	**0,94±0,15**	**0,11±0,01**
SOD epi. U/g tej.	**369,14±59,17**	**508,14±145**
Proteínas epi. mg/g tej.	**33,02±4,16**	**48,29±14,20**

Tabla 73. Parámetros significativamente distintos entre los animales control y los animales control con filtro. p<0,05.

Nos planteamos también ver las modificaciones que era capaz de producir el filtro solar por sí solo en animales no irradiados.

En eritrocitos, el filtro provocaba un aumento de la GST termoestable y del porcentaje de GST residual, un aumento en la CAT, el GSH y los TBARS. En plasma, el filtro disminuyó el GSH con el consiguiente aumento del GSSG y en consecuencia también disminuyó la relación GSH/GSSG y finalmente también estaban disminuidos significativamente los TBARS.

Respecto a la epidermis, aumentó la actividad GST, lo que provocó una disminución del GSH y un aumento del GSSG, igual que sucedía en plasma, y también estaba aumentada significativamente la SOD.

4.4. Análisis y discusión de los resultados obtenidos con los filtros

Los resultados obtenidos con los animales irradiados, con y sin filtro solar, no son comparables con los obtenidos en los estudios de irradiación aguda, ya que las pautas de irradiación fueron distintas. Es especialmente importante señalar que los animales del estudio con el fotoprotector fueron sometidos a dos irradiaciones con un intervalo de 24 horas. Por lo tanto, el efecto del estrés provocó alteraciones distintas en estos animales que en el estudio de irradiación aguda, en el que los animales sólo se irradiaron una vez.

Vemos que la irradiación en los animales sin filtro induce un aumento de la GST termoestable eritrocitaria, junto con un incremento del cociente GSH/GSSG. Este incremento del cociente se hace a expensas tanto del aumento de los valores de GSH como de una disminución del GSSG. Al mismo tiempo, en el eritrocito, se observa una disminución de la actividad GPx. Todos estos cambios sugieren una mayor actividad de la GSH sintetasa, que favorece la disponibilidad de GSH y una mayor afinidad de la actividad GST global, derivada del aumento del porcentaje de enzima termoestable. La mayor producción de ERO generaría mayores niveles de peróxidos que llegarían a saturar parcialmente la actividad GPx, con un descenso del GSSG. En esta situación, la actividad de todos los sistemas enzimáticos eritrocitarios sería suficiente para mantener un nivel aceptable de estrés oxidativo, sin que se aprecie aumento de los valores de TBARS.

En cuanto a los valores observados en epidermis, se observa un incremento de la actividad GST, GPx y GR. Esto indica una mayor producción de ERO que induciría una mayor actividad de estos sistemas de defensa, con un mayor consumo del GSH, tanto por parte de la GST como de la GPx. En cualquier caso, los animales irradiados mantienen los niveles de TBARS por debajo de los valores control, lo que indicaría una eficacia de estos sistemas de defensa.

En conjunto, pues, se comprueba que tras dos irradiaciones de 1 DEM, con un intervalo de 24 horas, se producen diversas alteraciones de los sistemas de defensa relacionados con la producción de ERO. El hecho de que tras irradiaciones repetidas a dosis inferiores a 1 DEM (estudio de irradiación crónica) también aparezcan alteraciones de estos sistemas confirma que la energía UV ya induce cambios significativos en la epidermis y en el eritrocito con dosis energéticas inferiores a las necesarias para desencadenar eritema.

En los animales irradiados y protegidos con filtro, se observaron muy pocas alteraciones, en comparación con los animales irradiados sin filtro (tablas 71 y 72). Esto indica que el filtro no sólo ha sido capaz de proteger frente al eritema, sino también frente a una gran parte de las alteraciones bioquímicas inducidas por la RUV. Por otra parte, hay que destacar que algunas de las variaciones observadas en los animales irradiados con filtro se deben a los cambios inducidos por el propio filtro, debidos a algunos de los ingredientes de la preparación utilizada. En este sentido, es especialmente importante señalar que en dicha formulación había aceite de germen de trigo, aceite de girasol y extracto de soja con fitoestrógenos, así como butilhidroxitolueno. Estos cambios se aprecian mejor si comparamos los resultados obtenidos en animales pseudoirradiados con filtro con los animales pseudoirradiados sin filtro (tabla 73). Así, los ingredientes del filtro inducen un aumento de la actividad GST termoestable, lo cual redunda en una mayor eficacia de la actividad de la enzima y un aumento del GSH disponible, probablemente por el aporte de aminoácidos que facilita la síntesis de nuevas moléculas del tripéptido. Al mismo tiempo, hay una mayor disponibilidad de la CAT eritrocitaria. Más difícil de explicar es el aumento de los valores de TBARS eritrocitarios, que podrían simplemente ser

debidos a una mayor presencia de lípidos por el aporte de los componentes del filtro. Esta mayor presencia de lípidos favorecería las reacciones de lipoperoxidación y explicaría también el aumento de la actividad CAT.

En epidermis, el mayor aporte proteico (MPC) facilitado por el filtro obliga a valorar los cambios observados con prudencia. En efecto, en los animales tratados con filtro hay una mayor cantidad de proteínas, por lo cual es poco representativo hacer comparaciones basadas en dicho contenido proteico. Por lo tanto, debemos basarnos en los cambios observados expresados por gramo de tejido. Así, vemos que existe una mayor disponibilidad de la GST y de la SOD en valores absolutos. La mayor actividad GST consume más cantidad de GSH y la mayor presencia de SOD genera más hidroperóxidos que se traducen por una mayor concentración de GSSG, procedente de la actividad GPx. Todo ello dentro de los límites aceptables, ya que no aumentan los TBARS.

Algunos de estos efectos concuerdan con trabajos previamente publicados por otros autores, en relación con los efectos de los ácidos grasos de aceites vegetales y de los fitoestrógenos. Así, Rohrdanz et al (2002) describen un aumento de la actividad CAT en cultivos de células de hepatoma en presencia de fitoestrógenos. Mizutani et al (2000) describieron un aumento de GSH en ratas tras la administración de daidzeína, genisteína o resveratrol. De todos modos, los efectos de los ácidos grasos vegetales y de los fitoestrógenos sobre los mecanismos de defensa relacionados con el estrés oxidativo no están claros y algunos resultados son contradictorios. Así, Ansell et al (2004) describen que los estrógenos naturales y los fitoestrógenos disminuyen la síntesis de GST, de quinona reductasa y de otras enzimas implicadas en los procesos de metabolización de fase II; Mortensen et al (2001) observaron que el 17-β-estradiol, pero no así la naringenina, disminuía la actividad de la GST hepática y aumentaba los valores de LDL oxidadas en conejos ovariectomizados. Rohrdanz et al (2002) demuestra que, a pesar del aumento de la actividad catalasa inducida por la daidzeína, dicho fitoestrógeno no protege del estrés oxidativo derivado del peróxido de hidrógeno y que la propia daidzeína posee una cierta actividad promotora del estrés oxidativo. Finalmente, Ruiz-Gutiérrez et al. (2001) demuestran que la dieta rica en ácidos grasos procedentes de aceites de

pescado inducen un aumento de CAT, GPx y SOD en hígado de rata mayor que los animales alimentados con dietas ricas en aceites de oliva y de girasol.

No hemos encontrado antecedentes que permitan explicar la disminución de las concentraciones de GSH plasmático y el aumento de los valores del GSSG en los animales tratados con el fotoprotector.

En resumen, los animales irradiados en presencia de filtro muestran menores afectaciones que los irradiados sin filtro, asumiendo que ambos grupos de animales han absorbido la misma cantidad de energía UV. Pero, en cualquier caso, es evidente que algunos de los ingredientes de la fórmula fotoprotectora ensayada pueden inducir cambios significativos en los sistemas de defensa anti-radicalares.

VI. DISCUSIÓN GLOBAL

La radiación ultravioleta procedente de la luz solar ejerce efectos beneficiosos sobre nuestro organismo, a través de su acción sobre la piel, como la síntesis de vitamina D, pero también es responsable de efectos adversos. Entre estos últimos, el efecto más evidente e inmediato es la aparición del eritema solar, o quemadura de primer grado, especialmente visible en las pieles del tipo I y II, pero también en las de tipo III durante las primeras exposiciones (Pathak, 1996; Pinnell, 2003). Uno de los problemas que plantea la exposición a los rayos UV es establecer el nivel de seguridad aceptable que permita al organismo asimilar la energía recibida sin riesgos. Hasta ahora, la fotoprotección mediante filtros solares se basa en la capacidad de dichos filtros para absorber la energía UV, medida según el denominado FPS (factor de protección solar). Dicho FPS viene determinado por la capacidad del filtro para prevenir la aparición del eritema, pero si alguno de los efectos adversos derivados de la exposición a los rayos UV aparece ya con dosis energéticas inferiores a las necesarias para desencadenar eritema, entonces el valor del FPS es insuficiente para garantizar una adecuada fotoprotección.

Diversos trabajos han demostrado que con energías UV inferiores a las necesarias para producir eritema ya disminuye el número de células de Langerhans (Aberer et al., 1981; Bacci et al., 1998; Young y Walker 1999). En el presente trabajo, hemos podido comprobar que a dosis equivalentes a 1 DEM también se producen alteraciones en los sistemas de defensa frente a los radicales libres y a las ERO en general. En los estudios de irradiación crónica, con energías inferiores a 1 DEM, también se producen alteraciones en dichos sistemas de defensa, además de la disminución de las células de Langerhans. Estos resultados ponen de manifiesto, una vez más, la necesidad de establecer los niveles de seguridad frente a la energía UV por debajo de la DEM.

Del trabajo presentado, queremos destacar, en primer lugar, el interés del modelo animal utilizado: la rata *hairless*. Este modelo permite estudiar simultáneamente una amplia gama de parámetros relacionados con el estrés oxidativo, tanto en la piel como en la sangre, y tiene la ventaja de que los animales están desprovistos de

pelo. En este sentido, la mayoría de trabajos relacionados con el estrés oxidativo en piel o sangre, en relación o no con la radiación UV, se han desarrollado en ratones *hairless* o en otros animales provistos de pelo (Noona, 1981; Aberer et al., 1981; Jun et al., 1988). Asimismo, dichos trabajos se centraban en el estudio de un número reducido de parámetros relacionados con el estrés oxidativo, sin poder obtener una visión de conjunto de los sistemas relacionados con el GSH y la formación de superóxido y peróxidos. Al mismo tiempo, a diferencia de los ratones *hairless*, la rata *hairless* proporciona suficiente cantidad de material biológico para poder estudiar simultáneamente los sistemas relacionados con el estrés oxidativo en sangre y piel, junto con el análisis de las células de Langerhans, sin necesidad de proceder a una depilación, generalmente traumática. En este sentido, pues, consideramos que el modelo utilizado es, en buena medida, una aportación original tal como se expuso en una publicación previa (Romeu et al., 2002).

En cuanto a los resultados obtenidos, es importante destacar que a dosis de energía UV bajas, equivalentes tan sólo a 1 DEM, se afectan sistemas relacionados con el estrés oxidativo del eritrocito. Es decir, los efectos de la RUV sobrepasan ampliamente la barrera epidérmica. Esta afectación sin duda obedece al aumento de producción de ERO a partir de la piel irradiada, que afecta a todo el organismo. En las pautas de irradiación aguda, los efectos son distintos en función de la dosis de energía recibida. En el eritrocito, en general podemos concluir que, a las dosis más bajas, los sistemas de defensa se activan lo suficiente para mantener controlado el aumento de ERO, como lo demuestra que los valores de TBARS no inicien un ascenso hasta las dosis de energía equivalentes de 1,56 DEM.

En la epidermis, se pone de relieve la importante función del sistema GST en la detoxificación de los compuestos electrofílicos generados tras la RUV, así como las diversas adaptaciones del resto de las enzimas relacionadas con el GSH, como la GR y la GPx. El aumento de la actividad SOD sin duda refleja el aumento de producción del radical superóxido. En conjunto, a las dosis de energía más bajas (1 DEM y 1,25 DEM) los sistemas de defensa se muestran suficientes para neutralizar el exceso de ERO generados, pero a la dosis de 1,56 DEM ya se observa un aumento de la concentración de TBARS, indicativo de que se han superado dichos sistemas defensivos.

Los efectos de la RUV tras la exposición crónica a dosis suberitemógenas son lógicamente menos evidentes que tras la exposición aguda de dosis superiores. Lo más importante de estos resultados es que demuestran la existencia de alteraciones en los parámetros relacionados con el estrés oxidativo y una reducción del número de células de Langerhans, aún a dosis claramente suberitemógenas y espaciadas en el tiempo. Desde el punto de vista práctico, aplicable a la especie humana, muchas personas exponen su piel a radiaciones suberitemógenas todos los días del año, con picos importantes de exposición durante el verano, práctica de deportes de verano e invierno, actividades profesionales al aire libre, etc. Es de esperar, pues, que las alteraciones observadas en el modelo de exposición crónica se produzcan también en el ser humano durante esas exposiciones "involuntarias" a los rayos UV.

Los efectos de la RUV sobre la piel a dosis suberitemógenas han sido estudiados por diferentes autores, sobre todo desde la vertiente de pérdida de células de Langerhans (Bergstresser et al., 1980; Noona et al., 1984; Bacci et al., 1998) y de las alteraciones histológicas cutáneas como elastosis, colagenosis, trastornos de la pigmentación, cáncer de piel, etc (Varani et al., 2001; Kang et al., 2001). En cambio, el estudio de las alteraciones de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo en sangre y epidermis está muy poco estudiado. Los resultados obtenidos en el modelo de irradiación crónica reafirman la conveniencia de revisar a la baja los índices de seguridad en el uso de fotoprotectores. En este sentido, la disminución del número de células de Langerhans continúa siendo un buen indicador como señal de alerta para determinar los niveles de seguridad tras la exposición a la RUV. No obstante, la determinación de este parámetro exige la práctica de biopsias cutáneas y, por tanto, limita su utilidad. El hecho de que determinados parámetros sanguíneos se correlacionen con el número de células de Langerhans, como la acividad GST, CAT y GPx y las concentraciones eritrocitarias de GSH y GSSG y que, especialmente, la GPx y el GSH eritrocitarios se comporten como variables predictoras del número de células de Langerhans, puede ser de gran ayuda para establecer el umbral de afectación de las CL tras la URV, sin necesidad de practicar biopsias cutáneas.

En cualquier caso, en nuestra opinión, es necesario establecer nuevos criterios para la determinación del FPS de los filtros solares, basados precisamente en aquellos indicadores más precoces de alteración celular y molecular, como los descritos en nuestro trabajo. Es previsible que, desde esta nueva óptica, los FPS de los filtros solares deban reducirse considerablemente por dos razones fundamentales. La primera porque, según la normativa más al uso en la actualidad (COLIPA) el FPS de los fotoprotectores se basa en un modelo estándar, según el cual se aplica una cantidad de fotoprotector equivalente a 2mg/cm2. En realidad, es prácticamente imposible que un usuario de filtros solares se aplique dicha cantidad sobre su piel en un uso cotidiano; más probable es que la cantidad aplicada se sitúe alrededor de 1mg/cm2, con lo cual el valor del FPS se reduce prácticamente a la mitad. La segunda razón es que, como hemos visto, bastan dosis claramente inferiores a 1 DEM para inducir alteraciones en el número de células de Langerhans y en los sistemas de defensa frente a las ERO. Por todo ello, no sería aventurado sugerir que los valores nominales de los actuales filtros solares se redujeran como mínimo a la tercera parte.

En otro orden de cosas, no debemos olvidar que la exposición al sol se hace de manera continuada e inconsciente a lo largo de nuestra vida, fuera de las exposiciones puntuales que señalábamos antes (deportes, verano, etc.). Así, la piel de la cara, cuello y manos están expuestas al sol de manera permanente. En los meses de verano, esta exposición se extiende a brazos, pecho y piernas de manera importante. Es bien conocido que las alteraciones cutáneas debidas a la exposición solar, desde las más frecuentes y benignas (alteraciones de la pigmentación) a las más graves (elastosis y cáncer de piel) se dan preferentemente en las zonas expuestas al sol. Por todo ello, consideramos necesario impulsar una nueva cultura en temas de fotoprotección, que debería incluir una actitud de protección activa de la piel frente a esa agresión continua y solapada de la RUV, que no manifiesta sus efectos hasta pasados muchos años.

Las interrelaciones entre RUV, formación de radicales libres y de ERO y pérdida de la capacidad inmunitaria cutánea (células de Langerhans) pone de relieve la conveniencia de desarrollar fotoprotectores que contengan ingredientes

encaminados a potenciar los sistemas defensivos cutáneos y a minimizar los efectos de la RUV sobre el estrés oxidativo. En nuestro caso, hemos realizado algunas experiencias preliminares con una formulación que contenía diversos ingredientes que cumplían algunos de estos requisitos. La formulación utilizada presentaba un FPS nominal de 15, según el método COLIPA y, de acuerdo con los resultados obtenidos, fue capaz de prevenir eficazmente la aparición del eritema tras una exposición de RUV equivalente a 15 DEM. Pero, además, pudimos observar que, a igualdad de energía RUV recibida (supuestamente muy cercana a 1 DEM), los animales pretratados con filtro presentaban menos alteraciones que los animales irradiados con 1 DEM, sin fotoprotección. Es decir, los ingredientes de la fórmula ensayada fueron capaces de prevenir o contrarrestar algunas de las alteraciones inducidas por la RUV a una dosis equivalente a 1 DEM.

Por otra parte, parece que los ingredientes presentes en el filtro fueron capaces de modificar sustancialmente los sistemas de defensa antirradicalares, como lo demuestran las diferencias observadas entre los animales no irradiados con filtro y los controles no irradiados sin filtro. Una buena parte de estos cambios pudieron ser interpretados de manera lógica y considerados positivos, pero alguno de ellos no es fácilmente explicable, como la disminución de los valores de GSH plasmático. Aunque estos resultados son preliminares, es evidente que abren un camino lleno de posibilidades para el diseño de nuevos fotoprotectores que no se limiten únicamente a filtrar la RUV, sino que también contribuyan a potenciar los mecanismos de defensa antirradicalares y a neutralizar los efectos de la RUV de manera más eficaz.

VII. CONCLUSIONES

1. La rata *hairless* es un buen modelo para estudiar los efectos sistémicos y cutáneos relacionados con el estrés oxidativo y la pérdida de la capacidad inmunitaria, derivados de la radiación UV.

2. La radiación UV, a partir de dosis equivalentes a 1 DEM, induce cambios sistémicos y cutáneos en los sistemas de defensa específicos frente al estrés oxidativo, simultáneamente a la pérdida de la inmunidad cutánea.

3. Dosis suberitemógenas y repetidas de radiación UV, asimilables a las que recibe una persona sometida a exposiciones moderadas al sol, también determinan pérdida de la inmunidad cutánea y alteraciones indicativas de desequilibrio oxidativo.

4. El número de células de Langerhans de la epidermis se correlaciona con diversos parámetros sanguíneos y epidérmicos relacionados con el estrés oxidativo. El hecho de que la actividad de la glutatión peroxidasa y la concentración de glutatión reducido eritrocitarios sean predictores del número de células de Langerhans, sugiere la posibilidad de que dichos parámetros constituyan una alternativa válida para evaluar indirectamente la capacidad inmunitaria cutánea.

5. La determinación del factor de protección solar, basado exclusivamente en la capacidad de prevención del eritema, no ofrece las garantías necesarias para una fotoprotección segura frente a la radiación UV. Es necesario adoptar nuevos criterios de fotoprotección, basados en indicadores más sensibles y precoces que el eritema.

6. Los valores del factor de protección solar que presentan los fotoprotectores actuales deben someterse a un juicio crítico. En este sentido, sería prudente reducir dichos valores a la mitad o a la tercera parte.

7. Puesto que muchos de los efectos de la radiación UV derivan del estrés oxidativo, es muy recomendable desarrollar nuevas fórmulas fotoprotectoras que incluyan principios activos capaces de restaurar el equilibrio oxidativo y de neutralizar los efectos de los radicales libres.

VIII. BIBLIOGRAFÍA.

1. Aberer W, Schuler G, Stingl G, Hönigsmann, Wolf K. Ultraviolet light depletes surface markers on Langerhans cells. J Investig Dermatol 1981; 76(3): 202-210.

2. Aikens J, Dix TA. Perhydroxyl radical (HOO·) initiated lipid peroxidation: the role of fatty acid hydroperoxides. J Biol Chem 1991;266:15091-15098.

3. Akashi M, Hachiya M, Paquette RL, Osawa Y, Shimizu S, Suzuki G. Irradiation increases manganese superoxide dismutase MRNA levels in human fibriblasts J Biol Chem 1995;270:15864-15869.

4. Alam M, Ratner D. Cutaneous squamous-cell carcinoma. NEJM 2001; 344.

5. Amron DM, Moy RL. Stratospheric ozone depletion and its relationship to skin cancer. J Dermatol Surg Oncol 1991; 17:370-372.

6. Ansell PJ, Espinosa-Nicholas C, Curran EM, Judy BM, Philips BJ, Hannink M, Lubahn DB. In vitro and in vivo regulation of antioxidant response element-dependent gene expression by estrogens. Endocrinology, 2004; 145:311-317.

7. Armstrong R, Sohal RG, Cutler RG, Slater TF. Free Radicals Molecular Biology, Aging and Disease. Raven, New York (1984).

8. Aronoff S. Catalase: kinetics of photooxidation. Science 1965;150:72-73.

9. Audic A, Giacomoni PU. DNA nicking by ultraviolet radiation is enhanced in the presence of iron and oxygen. Photochem Photobiol 1993;57:508-512.

10. Awasthi YC, Sharma R, Singhal SS. Human glutathione S-transferases. Int J Biochem 1994;26:295-308.

11. Axelrod M, Serafin D, Klitzman B. Ultraviolet light and free radicals: an immunologic theory of epidermal carcinogenesis. Plast Reconstr Surg 1990; 86(3): 582-593.

12. Bacci S, Romagnoli P, Streilein JW. Reduction in Number andmorphologic alterations of Langerhans cells after UVB radiation in vivo are accompanied by an influx of monocytoid cells into the epidermis. J Invest Dermatol 1998;111:1134-1139.

13. Beremblum I. A speculative review: The probable nature of promoting action and its significance in the understanding of the mechanism of carcinogenesis 1954. Cancer Res; 14: 471-477.

14. Berg D, Otley CC. Skin Cancer in organ transplant recipients:epidemiology, pathogenesis, and management. J Am Acad Dermatol 2002;47:1-17.

15. Bergendi L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. Life Sci 1999; 65:1865-74.

16. Bergstresser PR, Toews GB, Streilein JW. Natural and perturbed distributions of Langerhans cells: responses to ultraviolet light, heterotopic skin grafting, and dinitrofluorobenzene sensitization. J Investig Dermatol 1980; 75: 73-77.

17. Berhane K, Widersten M, Engstrom A, Kozarich JW, Manervik B. Detoxification of base propenals and other alpha, beta-unsatured aldehyde products of radicalreactions and lipid peroxidation by human glutathione trasnferases. Proc Natl Acad Sci USA 1994;9:1480-1484.

18. Berneburg M, Plettenberg H, Krutmann J. Photoaging of human skin. Photodermatol Photoimmunol Photomed 2000; 16:239-244.

19. Berneburg M, Grether-Beck S, Kurten V, Ruzicka T, Briviba K, Sies H. Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. J Biol Chem 1999;274:15345-9.

20. Birch-Machin M, Tindall M, Turner R, Haldane F, Rees J. Mitochondrial DNA deletions in human skin reflect photodamage rather than chronologic aging. J Invest Dermatol 1998;110149-152.

21. Black HS, deGruijl FR, Forbes PD, Cleaver JE. Photocarcinogenesis: an overview. Photochem Photobiol 1997;40:29-47.

22. Blake DR, Rallen RE, Lunec J. Free radicals in biological systems a review orientated to inflammatory processes. Br Med Bull 1987; 45:371-385.

23. Board PG, Baker RT, Chelvanayagam, Jermiin LS. Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. Biochem J 1997;328;929-935.

24. Bruls WA, van Weelden H, van der Leun JC. Transmission of UV-radiation through human epidermal layers as a factor influencing the minimal erythema dose. Photochem Photobiol 1984; 39(1): 63-72.

25. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol 1978; 52:302-310.

26. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. Annu. Rev. Biochem 1989;51:79-110.

27. Campbell JAH, Corrigal AV, Guy A, Kirsch RE. Immunohistologic localization of alpha , mu and pi class glutathione S-transferases in human tissues. Cancer 1991;67:1608-1613.

28. Cerimele D, Celleno L, Serri F. Physiological changes in ageing skin. Br J Dermatol 1990; 122 (suppl. 25): 13-20.

29. Cerutti PA. Prooxidant states and tumor promotion. Science 1985;227:375-381.

30. Chaker MB, Tharp MD, Bergstresser PR. Rodent epidermal Langerhans cells demonstrate greater histochemical specificity for ADP than for ATP and AMP. J Investig Dermatol 1984; 82(5): 495-500.

31. Choe M, Jackson C, Yu BP. Lipid peroxidation contributes to age-related membrane rigidity. Free Radical Biol Med 1995;18:977-984.

32. Chung JH, Seo JY, Choi HR, Lee MK, Youn CS, Rhie GE. Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin in vivo. J Invest Dermatol 2001;117:1218-24.

33. Church SL, Grant JW, Ridnour LA, Oberley LW, Swanson PE, Meltzer PS, Trent JM. Increased manganase superoxide dismutase expression suppresses the malignant phenotype of human melanoma cells. Proc Nat Acad Sci USA 1993;90:3113-3117.

34. Cleaver JE, Bootsma D. Xeroderma pigmentosum: Biochemical and genetic characteristics. Annu Rev Genet 1975; 9: 19-38.

35. Cohen G, Dembiec D, Marcus J. Measurement of catalase activity in tissue extracts. Anal Biochem 1970; 34: 30-38.

36. Connor MJ, Wheeler LA. Depletion of cutaneous glutathione by ultraviolet radiation. Photochem Photobiol 1987;46:239-245.

37. Darr D, Fridovich I. Free radicals in cutaneous biology. J Invest Dermatol 1994; 102: 671-675.

38. Davies KJA, Wiese AG, Sevanian A, Kim EH. Repair systems in oxidative stress. In:Finch CE, Johnson TE (eds). Molecular Biology of Aging, Wiley Niss,1990. New York.

39. Daynes RA, Spellman CW. Evidence for the generation of supressor cells by ultraviolet radiation. Cell Immunol 1977; 74:1688-1692.

40. de Gruijl FR, van der Leun JC. Systemic influence of pre-irradiation of a limited skin area on UV-tumorigenesis. Photochem Photobiol 1982; 35: 379-383.

41. de Gruijl FR, van der Leun JC. Estimate of the wavelength dependency of ultraviolet carcinogenesis in humans and its relevance to the risk assessment of stratospheric ozone depletion. Health Phys 1994;67:319-325.

42. de Gruijl FR. Photocarcinogenesis: UVA vs UVB. Singlet oxygen, UVA, and ozone. Methods Enzymol 2000;319:359-66.

43. Del Boccio G, Di Ilio C, Alin P, Jornvall H, Mannervik B. Identification of a novel glutathione transferase in human skin homologous with class α glutathione transferase 2-2 in the rat. Biochem J 1987;244:21-25.

44. Demple B. Oxidative DNA damage: repair and inducible cellular responses. Mutat Envirom 1990; A:155-167.
45. De Paulet AC. Radicaux libres et vieillissement. Ann Biol Clin 1990; 48 (5): 323-330.

46. Dubreuilh W. Des hyperkeratoses circonscriptes. Ann Dermatol Syph (Series 3) 1896;7:1158-1204.

47. Dumaz N. UV-induced mutation spectrum in the p53 gene of skin tumors from DNA repair deficient xeroderma pigmentosum patients. Proc Nat Acad Sci USA 1993; 90: 10529-10533.

48. Duthie MS, Kymber I, Norval M. The effects of ultraviolet radiation on the human immune system. Br J Dermatol 1999;140:995-1009.

49. Epstein JH, Roth HL. Experimental ultraviolet carcinogenesis: A study of croton oil promoting effects. J Investig Dermatol 1968; 50: 387-389.

50. Fazi A, Accorsi A, Piatti E, Magnani M. Cell dependent decay of human erythrocytes glutathione S-transferase. Mech Ageing Dev 1991; 58: 255-266.

51. Fisher MS, Kripke ML. Systemic alteration induced in mice by ultraviolet light irradiation and its relationship to ultraviolet carcinogenesis. Proc Nat Acad Sci USA 1977; 74:1688-1692.

52. Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S. Molecular basis of sun-induced premature skin aging and retinoid antagonism. Nature 1996;379:335-9.

53. Fisher GJ, Datta SC, Wang ZQ, Li XY, Quan TH, Chung JH. c-Jun dependent inhibition of cutaneous procollagen transcription following ultraviolet irradiation is reversed by all trans retinoic acid. J Clin Invest 2000;106:663-70.

54. Fisher GJ, Choi HC, Bata-Csorgo Z, Chao Y, Datta S, Wang ZQ. Ultraviolet irradiation increases matrix metalloproteinase-8 protein in human skin in vivo. J Invest Dermatol 2001;117:219-226.

55. Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. Arch Dermatol 1988;124:869-871.

56. Freeman BA, Grapo JD. Biology of disease. Free radicals and tissue injury. Lab Invest 1982;47:412-426

57. Fridovich I. Oxygen radicals, hydrogen peroxide, and oxygen toxicity, In: Prior W. (Ed) Free radicals in Biology. Academic Press 1977:239-277. New York.

58. Fridovich I. Superoxide radical:an endogenous toxicant. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1983;23:239-57.

59. Gaboriau F. Membrane damage induced in cultured human skin fibroblasts by UVA irradiation. Photochem Photobiol 1993;58:515-20.

60. Gaboriau F, Demoulins-Giacco N, Tirache I, Morliere P. Involvement of singlet oxygen in ultraviolet A-induced lipid peroxidation in cultured human skin fibroblasts. Arch Dermatol Res 1995;287:338-40.

61. Gebicki S, Gebicki JM. Formation of peroxides in amino acids and proteins exposed to oxygen free radicals. Biochem J 1993;289:743-749

62. Gilchrest BA, Soter NA, Hawk JL, Barr RM, Black AK, Hensby CN. Histologic changes associated with ultraviolet A-induced erythema in normal human skin. J Am Acad Dermatol 1983;9:213-9.

63. Gilchrest-BA; Tang A. Regulation of keratinocyte growth factor gene expression in human skin fibroblasts. Journal of Dermatol Sci 1996; 11(1): 41-50.

64. Greenwald RW, Moy WW. Effect of oxygen-derived free radicals on hyaluronic acid. Arthritis Rheum 1980;23:455-463.

65. Gunzler WA, Steffens GJ, Grossman A, Kim SMA, Otting F, Wendel A, Flohe L. The amino acid sequence of bovine glutathione peroxidase. Hoppe-Seyler's Z Physiol. Chem 1984;365:195-212.

66. Guthemberg C, Mannervik B. Glutathione S-transferase (transferase π) from human placenta is identical or closely related to glutathione S-transferase (transferase ρ) from erythrocytes. Biochim Biophys Acta 1981;661:255-260.

67. Gutteridge JMC, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. Trends Biochem Sci 1990;15:129-135.

68. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Gluthatione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem 1974; 249(22): 7130-7139.

69. Halliwell B. Current Status review: free radicals, reactive oxygen species and human disease; a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. Br J Exp Pathol 1989; 70: 737-757.

70. Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. FEBS Lett. 1991;281:9-19.

71. Halliwell B, Gutteridge JMC. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxil radical generation. FEBS Lett 1992;307:108-12.

72. Halliday GM, Bestak R, Yuen KS, Cavanagh Ll, Barnetson RS. UVA-induced immunosuppression. Mutat Res 1998;422:139-145.

73. Hanau D, Fabre M, Stampf J-L, Grosshans E, Benezra C. ATPase Langerhans cell staining: a technique allowing progression from light to electron microscope observation. J Investig Dermatol 1986; 86: 5-8

74. Hanau D, Fabre M, Schmitt DA, Garaud JC, Pauly G, Tomgio MM, Mayer S, Cazenave, JP. Human epitelial Langerhans cells cointernalize by receptor-mediated endocytosis "nonclassical" major histocompatibility complex calss I molecules (T6 antigens) and class II molecules (HLA-DR antigens) Proc Nat Acad Sci 1987; 84; 2901-2905

75. Hanau D, Fabre M, Schmitt DA, Garaud JC, Pauly G, Cazenave JP. Appearance of Birbeck granule-like structures in anti-T6 antibody-treated human epidermal Langerhans cell. J Investig Dermatol 1988; 90: 298-304

76. Hanson KM, Simon JD. Epidermal trans-urocanic acid and the UVA-induced photoaging of the skin. Proc Natl Acad Sci. USA 1998; 95: 10576-10578.

77. Harman D. Role of the free radicals in aging and disease. Ann N Y Acad Sci USA 1992;673:126-141.

78. Hayes JD, Strange RC. Potential contribution of the glutathione-S.transferase supergene family to resistance to oxidative stress. Free Radic Res Commun 1995;22:193-207.

79. Higuchi Y, Linn S. Purification of all forms of HeLa cell mitochondrial DNA and assessment of damage to it caused by hydrogen peroxide treatment of mitochondrial or cells. J Biol Chem 1995;270:7950-7956.

80. Hissin PJ, Hilf R. A fluorimetric method for determination of oxidized and reduced gluthatione in tissues. Anal Biochem 1976; 74:214-226.

81. Hodgson EK, Fridovich I. The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme. Biochemistry 1975;14:5294-5303.

82. Hoffschir F, Daya-Grosjean L, Petit PX, Nocentini S, Dutilaux B, Sarasin A, Vuillaume M. Low catalase activity in xeroderma pigmentosum fibroblasts and SV40-transformed human cell lines is directly related to decreased intracellular levels of the cofactor, NADPH. Free Radic Biol Med 1998;24:809-816.

83. Jamieson D. Oxygen toxicity and reactive oxygen metabolites in mammals. Free Rad Biol Med 1989;7:87-108.

84. Jun B-D, Roberts LK, Cho B-H, Robertson B, Daynes RA. Parallel recovery of epidermal antigen-presenating cell activity and contact hipersensitivity responses in mice exposed to ultraviolet irradiation: the role of a prostaglandin-dependent mechanism. J Investig Dermatol 1988; 90: 311-316.

85. Junod AF. Oxygen free radicals and lungs. Intensive Care Med 1989; 15: S21-S23.

86. Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ. Photoaging:pathogenesis, prevention, and treatment. Clin Geriatr Med 2001;17:617-630.

87. Kantor RRS, Giardina SL, Bartolazzi A, Toewnsend AJ, Myers CE, Cowan KH. Monoclonal antibodies to glutathione S-transferase Pi-immunohistochemical analysis of human tissues and cancers. Int J Cancer 1991;47:193-201.

88. Kawaguchi Y, Tanaka H, Okada T, Konishi H, Takahashi M, Ito M. Effect of reactive oxygen species on the elastin mRNA expression in cultured human dermal fibroblasts. Free Rad Biol Med 1997; 23:162-5.

89. Ketterer B, Meyer DJ. Glutathione transferases: a posible role in the detoxification and repair of DNA and lipid hydroperoxides. Mutat Res 1989;214:33-40.

90. Kielbassa C, Roza L, Epe B. Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. Carcinogenesis 1997;18:811-16.

91. Kielbassa C, Epe B. DNA damage induced by ultraviolet and visible light and its wavelenght dependence. Methods Enzymol 2000; 319; 436-445.

92. Kikuchi A, Takeda A, Onodera H, Kimpara T, Hisanaga K, Sato N, Nunomura A, Castellani RJ, Perry G, Smith MA, Itoyama Y. Systemic increase of oxidative nucleic acid damage in Parkinson's disease and multiple system atrophy. Neurobiol Dis 2002; 9:244-248.

93. Kono Y, Fridovich I. Superoxide radical inhibits catalase. J Biol Chem 1982. 257: 5751-5761.

94. Konohana A, Konohana I, Schroeder WT, O'brien WR, Amagai M, Greer J. Placental GST-pi mRNA is abundantly expressed in human skin. J Invest Dermatol 1990;95:119-126.

95. Kripke ML. Antigenicity of murine skin tumors induced by ultraviolet light. J Natl Cancer I 1974; 53: 1333-1336.

96. Kripke ML, Fisher MS. Immunologic parameters of ultraviolet carcinogenesis. J Natl Cancer I 1976; 57: 211-215.

97. Kripke ML, Fidler IJ. Enhanced experimental metastasis of ultraviolet light-induced fibrosarcomas in ultraviolet light-irradiated syngeneic mice. Cancer Res 1980; 40: 625-629.

98. Kripke ML. Immunologic mechanisms in UV radiation carcinogenesis. Adv Cancer Res 1981; 34: 69-106.

99. Kripke ML. Immunology and photocarcinogenesis. J Am Acad Dermatol 1986;14:149-155.

100. Krutmann J. New developments in photoprotection of human skin. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol 2001;14:401-7.

101. Lafuente A, Giralt M, Cervelló I, Pujol F, Mallol J. Glutathione S-transferase activity in human superficial transitional cell carcinoma of the bladder. Comparison with healthy controls. Cancer 1990;65:2064-2068.

102. Langerhans P. Über die Nerven der menschlichen Haut. Virchows Arch Pathol Anat 1868; 44: 325-337.

103. Liochev SI, Fridovich I. The role of superoxide anion on the production of $OH^{\cdot}$ in vitro and in vivo. Free Rad Biol Med 1994;16:29-33.

104. Lowe NJ, Meyers DP, Wieder JM, Luftman D, Borget T, Lehman MD. Low doses of repetitive ultraviolet A induce morphologic changes in human skin. J Invest Dermatol 1995;105:739-43.

105. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265-275.

106. Mackenzie IC, Squier CA. Cytochemical identification of ATPase-positive Langerhans cells in EDTA-separated sheets of mouse epidermis. Br J Dermatol 1975; 92:523-533.

107. Mannervik B, Awasthi YC, Board PG, Hayes JD, Di Ilio C, Ketterer B, Listowsky I, Morgenstern R, Muramatsu M, Pearson WR, Picket CB, Sato K, Widersten, Wolf CR. Nomenclature for human glutathione trasnferases. Biochem J 1992;282:305-306.

108. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinefrine and a simple assay for superoxide dismutase. J Biol Chem 1972; 247 (10):3170-3175.

109. Mizushima Y, Hoshi K, Yanagawa A, Takano K. Topical application of superoxide dismutase in cream. Drug Exp Clin Res 1991;17:127-131.

110. Mizutani K, Ikeda K, Nishikata T, Yamori Y. Phytoestrogens attenuate oxidative DNA damage in vascular smooth muscle cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. J Hypertens., 2000; 18:1833-1840.

111. Morliere P, Moysan A, Tirache I. Action spectrum for UV-induced lipid peroxidation in cultured human skin fibroblasts. Free Radic Biol Med 1995;19:365-371.

112. Moller P, Wallin H, Holst E, Knudsen LE. Sunlight-induced DNA damage in human mononuclear cells. FASEB J 2002;16:45-53.

113. Mortensen A, Breinholt V, Dalsgaard T, Frandsen H, Lauridsen ST, Laigaard J, Ottesen B, Larsen JJ. 17β-estradiol but not the phytoestrogen naringenin attenuates aortic cholesterol accumulation in WHL rabbits. J Lipid Res 2001; 42:834-843.

114. Moysan A, Morliere P, Marquis I, Richard A, Dubertret L. Effects od selenium on UVA-induced lipid peroxidation in cultured human skin fibroblasts. Skin Pharmacol 1995;8:139-148.

115. Nestle FO, Benchereau J, Hart D. Dendritic cells: On the move from bench to bedside.Nat Med 2001; 7(7): 761-765.

116. Nghiem DX, Kazimi N, Clydesdale G, Ananthaswamy HN Kripke ML, Ullrich SE. Ultraviolet A radiation suppresses an stablished immune response: Implications for sunscreen design. J Invest Dermatol 2001;117:1139-9.

117. Nielsen H. Covalent binding of peroxidized phospholipid to protein III. Reaction of individual phospholipids with different proteins 1981. 16:215-222.

118. Nohl H, Hegner D, Sumer KH. The mechanism of toxic action of hyperbaric oxygenation on the mitochondria of rat heart cells. Biochem Pharmacol 1981;30:1753-1757.

119. Noona FP. Supression of contact hypersensivity in mice by UV radiation and its relationship to UV-induced supression of tumor immunity. Photochem Photobiol 1981;34:683-689.

120. Noona FP, Bucana C, Saunder DN, Defabo EC. Mechanism of systemic immune supression by UV radiation in vivo. The UV effects on number and morphology of epidermal Langerhans cells and the UV-induced suppression of contact hypersensitivity have different wavelenght dependencies. J Immunol 1984;132:2408-2416.

121. Oota S. Some new aspects of Langerhans cells in the human epidermis: light and electron microscopy observations on the swelling sites seen in process terminals of the dendritic cells described by langerhans in 1868. Yonago Acta Med 1999; 42: 153-161.

122. Ortín F, Giralt M, Cervelló I, Nogués MR, Puerto AM, Argany N, Mallol J. Características cinéticas del sistema glutatión S-transferasa eritrocitario en función del sexo y del hábito tabáquico. Med Clin (Barc) 1996; 106: 607-610.

123. Pacifici GM, Franchi M, Colizi C, Giulani L, Rane A. GST in humans: development and tissue distribution. Arch Toxicol 1988;61:265-269.

124. Parsons PG, Hayward IP. Inhibition of DNA repair synthesis by sunlight. Photochem Photobiol 1985;42:287-93.

125. Pathak. Sunscreens: Progress and perspectives on photoprotection of human skin against UVB and UVA radiation. J Dermatol 1996; 23:783-800.

126. Pauly G, Pauly M. Photo-cyto-immuno-protection in day dermo-cosmetics: Interest of a complex of natural substances as an alternative to sunscreens. SÖFW-Journal 1996; 122: 520-542.

127. Peak JG, Peak MJ, Carnes BA. Induction of direct and indirect single strand breaks in human cell DNA by near and far ultraviolet radiation: action spectrum and mechanisms. Photochem Photobiol 1987;45:381-387.

128. Pence BC, Delver E, Dunn DM. Effects of dietary selenium on UVB-induced skin carcinogenesis and epidermalantioxidant status. J Invest Dermatol 1994;102:759-761.

129. Peters WHM, Wobbes T, Roelofs HMJ, Jansen JBMJ, Glutathione, Glutathione S-transferase and P-170 glycoprotein in metastases of malignant melanomas. Int J Oncol 1994;4:1323-1327.

130. Pinnell SR. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. J Am Acad Dermatol 2003;48:1-19.

131. Poswig A, Wenk J, Brenneisen P, Wlaschek M, Hommel C, Quel G, Faisst K, Dissemond J, Briviba K, Krieg T, Scharffetter-Kochanek. Adaptative antioxidant response of manganese-superoxide dismutase following repetitive UVA irradiation. J Invest Dermatol 1999;112:13-18.

132. Pound AW. Induced cell proliferation and the initiation of skin tumor formation of skin tumor formation in mice by ultraviolet light. Pathology 1970; 2: 269-275.

133. Pré J. The lipoperoxydation. Pathol Biol 1991; 39 (7): 716-736.

134. Prutz WA. Chemical repair in irradiated DNA solutions containing thiol and /or disulphides. Further evidence for disulphide radical anions acting as electron donors. Int J Radiat Biol 1989;56:21-33.

135. Pryor WA. Oxy-radicals and related species:their formation, life-times, and reactions. Annu Rev Physiol 1986;48:657-67.

136. Pryor WA, Church DP. Aldehides, hydrogen peroxide, and organic radical as mediators of oxygen toxicity. Free Rad Biol Chem 1991;11:41-46.

137. Randerath K, Reddy R, Danna TP, Watson WP, Crane AE, Randerath E. Formation of ribonucleotides in DNA modified by oxidative damage in vitro and in vivo. Characterization by ^{32}P-postlabeling. Mutat Res 1992;275:355-366.

138. Raza H, Awasthi YC, Zaim MT, Ezkert RL, Mukhtar H. Glutathione S-transferases in human and rodent skin: multiple forms and species-specific expression. J Invest Dermatol 1991;96:463-467.

139. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol 1963; 17: 208-212.

140. Ribera Pibernat, Paradelo García C. El sol y la piel: fotoprotección y filtros solares. Med Integral 1997; 30(2): 64-71.

141. Richard MJ, Potal B, Meo J, Coundray C, Hadjian A, Favier A. Malondialdehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react with thiobarbituric acid. Clin Chem 1992; 38: 704-709.

142. Rice-Evans C, Burdon R. Free radical lipid interactions and their pathological consequences Prog Lipid Res 1993;37:37-110

143. Roberts LK, Beasley DG. Commercial sunscreens lotions prevent ultraviolet-radiation-induced immune suppression of contact hypersensivity. J Invest Dermatol 1995;105:339-344.

144. Roffo AH. Cancer y Sol. Boletín Institucional de medicina experimental para el estudio y tratamiento del cáncer. Méjico. 1933; 10: 417-439.

145. Rohrdanz E, Ohler S, Tran-Thi QH, Kahl R. The phytoestrogen daidzein affects the antioxidant enzyme system of rat hepatoma H4IIE cells. J Nutr., 2002; 132:370-375.

146. Romeu M, Mulero M, Fortuño A, Giralt M, Folch J, Nogués MR, Torres A, Sureda FX, Cabré M, Paternáin JL, Mallol J. Parameters related to oxygen free radicals in erytrocites, plasma and epidermis of the hairless rat. Life Sci 2002; 71(15): 1739-1749.

147. Ross D, Albano E, Moldeus P. The generation and fate of glutathionyl radicals in biological systems. In: Poli G, Cheeseman KH, Dianzani MU, Slater TF (Eds.). Free Radicals in Liver Injury. IRL Press. Oxford 1987:17-20.

148. Ruiz-Gutierrez V, Vazquez CM, Santa-Maria C. Liver lipid composition and antioxidant enzyme activities of spontaneously hypertensive rats after ingestion of dietary fats (fish, olive and high-oleic sunflower oils). Biosci. Rep., 2001; 21:271-285.

149. Rusch HP, Kline BZ, Bauman CA. Carcinogenesis by UV rays with reference to wavelength and energy. Arch Pathol 1941; 371: 135-146.

150. Sander CSC. Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. J Invest Dermatol 2002;118:618-25.

151. Scaletta LJ, MacCallum DK. A fine structural study of divalent cation-mediated epithelial union with connective tissue in human oral mucosa. Am J Anat 1972; 133:431-454

152. Schmitt D. Cutaneous immunity and environment. Ann Dermatol Venereol 1991; 118: 931- 935.

153. Setlow RB. Cyclobutane type pyrimidine dimers in polynucleotides. Science 1966;153:379-380.

154. Setlow RB, Setlow JK. Effects of radiation on polynucleotydes. Annu Rev Biophys Bioeng 1972; 1: 293-346.

155. Setlow RB. Deficient human disorders and cancer. Nature 1978;271:713-717.

156. Sevanian A, Stein R, Mead JF. Metabolism of epoxidized phosphatidylcholine by phospholipase A2 and epoxide hydrolase 1981; 16:781-788.

157. Shimizu K, Toriyama F, Yoshida H. The expression of placental-type glutathione S-transferase (GST pi) in human cutaneous squamous cell carcinoma and normal human skin. Virchows Arch 1995;425:589-592.

158. Sies H. Oxidative Stress. Academic Press 1985. London

159. Simon JD. Spectroscopic and dynamic studies of the epidermal chromopheres trans-urocanic acid and eumelanin. Acc Chem Res 2000; 307-313.

160. Siwik DA, Pagano PJ, Colucci WS. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. Am J Physiol Cell Physiol 2001;280:C53-60.

161. Smith G, Stanley LA, Sim E, Strange RC, Wolf CR. Metabolic polymorphisms and cancer susceptibility. Cancer Surveys 1995;25:27-67.

162. Soehnge H, Ouhit H, Ananthaswamy HN. Mechanisms of induction of skin cancer by UV radiation. Front Biosci 1997; 2: d538-551.

163. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. Science 1992;23:162-5.

164. Steinberg P, Schramm H, Schladt L, Robertson LW, Thomas H, Oesch F. The distribution, induction and isoenzyme profile of glutathione S-transferase and glutathione peroxidase in isolated rat liver parenchymal, Kupffer and endothelial cells. Biochem J 1989;264:737-744.

165. Strange RC, Johnson PH, Lawton A, Moult JA, Tector MJ, Tyminski RJ, Cotton W. Studies on the variability of glutathione S-transferase from human erythrocytes. Clin Chim Acta 1982;120:251-260.

166. Streilein JW, Taylor JR, Vincek V, kurimoto I, Shimizu T, Tie C. Immune surveillance and sunlight-induced skin cancer: Immunol Today 1994;15:174-9.

167. Strikland PT, Creasia D, Kripke ML. Enhancement of two-stage skin carcinogenesis by exposure of distant skin to ultraviolet radiation. J Natl Cancer I 1985; 74: 1129-1134.

168. Sun Y. Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. Free Rad Biol Med 1990;8:583-599.

169. Takahashi G. Simultaneous fixation with glutaraldehyde, picric acid , osmium tetroxide mixture for electron microscopy. Proceedings of the 7th European Congress on Electron Microscopy, vol II. Edited by P Rederoo, W De Priester, Leiden University Press, The Netherlands, 1980, pp 746-747.

170. Trautinger F. Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin aging. Clin Exp Dermatol 2001; 26:573-577.

171. Toews GB, Bergstresser PR, Streilein. Langerhans cells: Sentinells of skin associated lymphoid tissue. J Investig Dermatol 1980; 75: 78-82.

172. Tyrrell RM, Pidoux M. Endogenous glutathione protects human skin fibroblasts against the cytotoxic action of UVB, UVA and near visible radiations. Photochem. Photobiol 1986; 44: 561-564.

173. Tyrrell RM, Pidoux M. Correlation between endogenous glutathione content and sensitivity of cultured human skin cells to radiation at defined wavelengths in the solar ultraviolet range. Photochem Photobiol 1988;47:405-412.

174. Tyrrell RM, Keyse SM, Moraes EC. Cellular defense against UVA (320-380 nm) and UVB (290-320) radiations. In: E. Riklis (Ed.), Photobiology, Plenum Press, New York, 1991:861-871.

175. Tyrrell RM. Oxidant, antioxidant status and photocarcinogenesis: the role of gene activation. Photochem Photobiol 1996;63:380-6.

176. Unna PG: Die Histopathologic der Hautkrankheiten. Berlin 1894; A. Hirschwald.

177. Urbach F. Geographic pathology of skin cancer, in "The biologic effects of ultraviolet radiation". Urbach F, Ed. Oxford. Pergamon Press, Ltd 1969; pp. 635-650.

178. Valenzuela A. The biological significance of malondialdehide determination in the assesment of tissue oxidative stress 1991; 48:301-309.

179. Varani J, Spearman D, Perone P, Fligiel SEG, Datta SC, Wang ZQ. Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen in vitro. Am J Pathol 2001;158:931-42.

180. Vessey DA. The cutaneous antioxidant system. Clin Dermatol 1993;8:81-103.

181. Webster NR, Nuun JP. Molecular structure of free radicals and their importance in biological reactions. Br J Anaesth 1988;60:98-108.

182. Wenczl E, Pool S, Timmerman AJ, Vanderschans GP, Roza L, Schothorst AA. Physiological doses of ultraviolet irradiation induce DNA strand breaks in culturedf human melanocytes, as detected by means of an immunochemical assay. Photochem Photobiol 1997;66:826-30.

183. Wendel A, Kerner B, Graupe K. The selenium moiety of glutathione peroxidase. Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem 1978;259:1035-1036.

184. Wolff Sp, Dean RT. Fragmentation of protein by free radicals and its effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis. Biochem J 1986;2234:399-403.

185. Wolpp SP, Garner A, Dean RT. Free radicals lipids and protein degradation. Trends Biochem Sci 1986;11:27-31.

186. Yaar M, Gilchrest BA. Skin aging: postulated mechanisms and consequent changes in structure and function. Clin Geriatr Med 2001;17:617-30.

187. Young AR, Potten CS, Nikaido O, Parsons PG, Boenders J, Ramsden JM, et al. Human melanocytes and keratinocytes exposed to UVB or UVA in vivo show comparable levels of thymine dimers. J Invest Dermatol 1998;111: 936-940.

188. Young AR, Walker SL. Sunscreens. Photoprotection of non-erythema endpoints relevant to skin cancer. Photodermatol Photoimmunol Photomed 1999;13:129-132.

189. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. J Clin Pathol 2001; 54: 176-86.

190. Zieper M, Zhang L, Priddy R, Xiao Y. The expression of placental glutathione S-transferase (GST-pi) in human normal salivary gland and tumors. Int J Oncol 1994;5:961-966.

IX. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

%	Porcentaje
(-SH)	Grupo tiol
ADP	Adenosina-difosfato
ATP	Adenosina-trifosfato
CAT	Catalasa
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenceno
CFCs	Clorofluorocarburos
CL	Célula de Langerhans
Coef	Coeficiente
DEM	Dosis Eritemógena Mínima
DNFB	Dinitrofluorobenceno
D.O.	Densidad óptica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
erit.	Eritrocito
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FPS	Factor de protección solar
GPx	Glutatión peroxidasa
GR	Glutatión reductasa
GSH	Glutatión reducido
GSSG	Glutatión oxidado
GSSG/GSH	Relación entre el glutatión oxidado y el reducido
GST	Glutatión S-transferasa

$H_2O^\bullet$	Radical perhidroxilo
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
Hb	Hemoglobina
HCl	Ácido clorhídrico
KCl	Cloruro de potasio
L-OH	Hidróxidos fosfolipídicos
$LOO^\bullet$	Radical alquilperoxilo fosfolipídico
L-OOH	Hidroperóxidos fosfolipídicos
MDA	Malondialdehido
ME	Microscopía electrónica
MER	Microscopía electrónica de rastreo
MET	Microscopía electrónica de transmisión
MF	Microscopía de fluorescencia
µmol	Micromoles
min	Minutos
mM	Milimolar
mmol	Milimoles
MMP	Metaloproteinasas de la matriz celular
MOF	Microscopía óptica de fluorescencia
MOV	Microscopía óptica visible
n	Número de casos de una muestra
Na_2CO_3	Carbonato sódico
NaCl	Cloruro de sodio
NAD	Dinucleótido de adenina y nicotinamida
NADP+	Fosfato del dinucleótido de adenina y nicotinamida

NADPH	Fosfato del dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido
$NaHCO_3$	Bicarbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NEM	N-etil-maleimida
nm	Nanómetros
nmol	Nanomoles
NO_2	Dióxido de nitrógeno
NOX	Moléculas de óxidos de nitrógeno
NS	No significativo
O_2	Oxígeno
$O_2^{\bullet -}$	Anión superóxido
ºC	Grados centígrados
$HO^{\bullet}$	Radical hidroxilo
OPT	O-phtalaldehido
PBS	*Phosphate buffered saline* (Tampón fosfato salino)
pH	Medida cuantitativa de la acidez o basicidad de una disolución
pl.	Plasma
PM	Peso molecular
PO_4H_2K	Fosfato diácido de potasio
PO_4H_2Na	Fosfato diácido de sodio
PO_4HK_2	Fosfato ácido de potasio
PO_4HNa_2	Fosfato ácido de sodio
Prot	Proteínas
Ref.	Referencia
RL	Radical libre

RLO	Radical libre de oxígeno
RNA	Ácido ribonucleico
RUV	Radiación ultravioleta
$RO^{\bullet}$	Radical alcoxi
RO*	Radical de oxígeno
$ROO^{\bullet}$	Radical peroxi
ROOH	Radical peróxido
S.P.S.S.	*Statistical Package for the Social Sciences*
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	*Tiobarbituric acid reactive substances*
TCA	Ácido tricloracético
Tej.	Tejido
U	Unidades
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C